



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DE CARNE DE FRANGO

CRISTIANO GAUTÉRIO SCHMIDT

PROF^a. DR^a. MYRIAM SALAS-MELLADO
ORIENTADORA

RIO GRANDE, RS

2008

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
MESTRADO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DE CARNE DE FRANGO

CRISTIANO GAUTÉRIO SCHMIDT
Engenheiro de Alimentos

Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre em
Engenharia e Ciência de Alimentos.

PROF^a. Dr^a. MYRIAM SALAS-MELLADO
ORIENTADORA

Rio Grande, RS

2008

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Senhor meu Deus, que tornou isto possível na minha vida, me sustentando com a sua destra em todos os momentos difíceis desta jornada.

A minha mãe, Rosana Gautério, que nunca mediu esforços para fazer o melhor por mim.

A todos os meus familiares, principalmente minhas avós, minha irmã, meu padrasto e meu pai, por todo carinho e incentivo.

A minha noiva, Jose Ribeiro, por todo amor, incentivo, carinho, paciência, compreensão e companheirismo.

A professora Myriam Salas-Mellado, pela orientação, confiança, incentivo, dedicação e amizade.

Aos professores Carlos Prentice, Luís Antônio, Janaína Burkert e Eliana Furlong pela disponibilidade e ensinamentos.

Aos colegas de laboratório Gustavo, Wiliam, Liane, Vilásia, Lúcia, Graciela, Kessiane e Pâmela, pelo auxílio no desenvolvimento no trabalho.

Aos futuros engenheiros de alimentos André, Inajara, Caroline e Carolina, pelo auxílio no desenvolvimento experimental deste trabalho e pela amizade.

As funcionárias Maria da Graça e Islanda, pela disponibilidade, suporte técnico, paciência, carinho e amizade.

A Capes e ao Projeto Chill-on pelo apoio financeiro, e também a FURG pela infra-estrutura.

A todas as pessoas que de alguma forma tornaram isso possível.

MUITO OBRIGADO!!!

“A benção do Senhor é que enriquece, e não acrescenta dores”.

(Provérbios 10:22)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE NOMECLATURA	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Mercado de Carne de Aves	3
2.2 Proteínas	3
2.2.1 Proteínas do músculo animal	4
2.2.2 Proteínas da carne de aves	5
2.2.3 Estrutura miofibrilar do músculo animal	6
2.2.4 Colágeno	8
2.2.5 Elastina	8
2.3 Enzimas	9
2.3.1 Classificação	9
2.3.2 Usos Industriais	10
2.3.3 Enzimas proteolíticas	11
2.3.4 Alcalase e Flavourzyme	12
2.4 Hidrolisados Protéicos	15
2.4.1 Hidrolisados protéicos de carne de aves	16
2.5 Grau de Hidrólise (GH)	17
2.6 Fatores que Influenciam o Processo de Hidrólise Enzimática	18
2.6.1 Efeito do pH na atividade enzimática	19
2.6.2 Efeito da temperatura nas reações enzimáticas	20
2.6.3 Relação enzima/substrato	21
2.7 Propriedades Funcionais das Proteínas e dos Hidrolisados Protéicos	21
2.7.1 Propriedades funcionais hidrofílicas	23
2.7.1.1 Solubilidade	23
2.7.1.2 Capacidade de retenção de água (CRA)	24
2.7.2 Propriedades de superfície	25
2.7.2.1 Capacidade emulsificante	25
2.7.2.2 Capacidade de retenção de óleo (CRO)	26
2.7.2.3 Capacidade de formação e estabilização de espuma	26
2.8 Digestibilidade <i>in vitro</i>	27
2.9 Secagem de Alimentos	28
2.9.1 Curvas de secagem	28
2.9.2 Teoria da difusão líquida	30
2.10 Aplicações dos Hidrolisados Protéicos	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Material	34
3.1.1 Matéria-prima	34
3.1.2 Enzimas	34
3.1.3 Reagentes químicos	34
3.1.4 Infra-estrutura	35
3.2. Métodos	35
3.2.1 Determinações físico-químicas	35
3.2.1.1 Composição proximal	35
3.2.1.2 Determinações físicas	35

3.2.2	Processo de obtenção do hidrolisado protéico de carne de frango	35
3.2.2.1	Carne de frango	36
3.2.2.2	Homogeneização	36
3.2.2.3	Hidrólise enzimática	36
3.2.2.4	Inativação enzimática	37
3.2.2.5	Desidratação	38
3.2.2.6	Hidrolisado protéico de carne de frango (HPCF)	38
3.2.2.7	Propriedades funcionais e nutricionais	38
3.2.3	Grau de hidrólise	38
3.2.4	Planejamento experimental	38
3.2.5	Secagem dos hidrolisados	40
3.2.5.1	Metodologia aplicada no tratamento dos resultados experimentais	40
3.2.6	Caracterização da funcionalidade dos hidrolisados enzimáticos de carne de frango	42
3.2.6.1	Propriedades de hidratação	42
3.2.6.1.1	Solubilidade e capacidade de retenção de água (CRA)	42
3.2.6.2	Propriedades de superfície	43
3.2.6.2.1	Capacidade emulsificante (CE)	43
3.2.6.2.2	Determinação da capacidade de retenção de óleo (CRO)	44
3.2.6.2.3	Propriedades espumantes	44
3.2.7	Digestibilidade <i>in vitro</i>	45
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	Caracterização Físico-química da Matéria-prima	47
4.1.1	Composição proximal da carne de frango	47
4.1.2	Valor de pH da carne de frango	48
4.2	Resultados do Planejamento Experimental	48
4.2.1	Grau de hidrólise (GH) obtido com a enzima Alcalase sobre peito e coxa de frango	48
4.2.1.1	Análise dos efeitos principais e suas interações para a resposta grau de hidrólise com a enzima Alcalase sobre peito e coxa de frango	50
4.2.1.2	Verificação do modelo matemático para o grau de hidrólise em peito de frango com a enzima Alcalase	55
4.2.1.3	Verificação do modelo matemático para o grau de hidrólise em coxa de frango com a enzima Alcalase	58
4.2.2	Grau de hidrólise (GH) obtido com a enzima Flavourzyme sobre peito e coxa de frango	60
4.2.2.1	Análise dos efeitos principais e suas interações para a resposta grau de hidrólise com a enzima Flavourzyme	62
4.2.2.2	Verificação do modelo matemático para o GH em peito de frango com a enzima Flavourzyme	64
4.2.2.3	Verificação do modelo matemático para o GH em coxa de frango com a enzima Flavourzyme	65
4.3	Secagem dos Hidrolisados de Carne de Frango	69
4.4	Composição Proximal dos Hidrolisados Secos Integrais	77
4.5	Propriedades Funcionais dos Hidrolisados Enzimáticos de Carne de Frango	79
4.5.1	Propriedades de Hidratação	79
4.5.1.1	Solubilidade	79
4.5.1.2	Capacidade de retenção de água (CRA)	83
4.5.2	Propriedades de superfície	87
4.5.2.1	Capacidade emulsificante (CE)	87
4.5.2.2	Capacidade de retenção de óleo (CRO)	91
4.5.2.3	Propriedades espumantes	93
4.5.2.3.1	Capacidade de formação de espuma	93

4.5.2.3.2 Estabilidade de espuma (EEs)	95
4.6 Digestibilidade <i>in vitro</i>	98
5. CONCLUSÃO	102
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
ANEXO A	117
ANEXO B	118
ANEXO C	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Produção Brasileira de Carne de Frango.	3
Tabela 2.2 - Principais proteínas do músculo de aves divididas em três grupos de acordo com a solubilidade e a porcentagem relativa no músculo úmido.....	5
Tabela 2.3 - Comparações relativas entre fibras musculares vermelhas e brancas em aves.	7
Tabela 2.4 - Sumário de detalhes e características fornecido pelos fabricantes de preparados de proteases disponíveis comercialmente	14
Tabela 3.1 - Matriz do planejamento fatorial completo 2 ³ para hidrólise enzimática das proteínas da carne de frango ($\alpha = 1,68$)	39
Tabela 4.1 - Composição proximal de diferentes cortes de carne de frango em base úmida e base seca.	47
Tabela 4.2 - Valores de pH em diferentes cortes de carne de frango.	48
Tabela 4.3 - Valores de grau de hidrólise (GH) utilizando peito e coxa de frango como substrato nos ensaios de hidrólise com a enzima Alcalase.	49
Tabela 4.4 - Efeitos estimados para o grau de hidrólise das proteínas de peito de frango com a enzima Alcalase.	51
Tabela 4.5 - Efeitos estimados para o grau de hidrólise das proteínas de coxa de frango com a enzima Alcalase.	51
Tabela 4.6 - Análise de variância dos valores de GH obtidos com a enzima Alcalase em peito de frango a um nível de confiança de 95%.....	55
Tabela 4.7 - Análise de variância dos valores de GH obtidos com a enzima Alcalase em coxa de frango a um nível de confiança de 95%.....	58
Tabela 4.8 - Valores de GH obtidos com a enzima Flavourzyme utilizando peito e coxa de frango como substrato.	60
Tabela 4.9 - Efeitos estimados para o grau de hidrólise em peito de frango com a enzima Flavourzyme.	62
Tabela 4.10 - Efeitos estimados para o grau de hidrólise em coxa de frango com a enzima Flavourzyme.	62
Tabela 4.11 - Análise de variância dos valores de GH obtidos com a enzima Flavourzyme em peito de frango a um nível de confiança de 95%.....	65
Tabela 4.12 - Análise de variância dos valores de GH obtidos com a enzima Flavourzyme em coxa de frango a um nível de confiança de 95%.....	65
Tabela 4.13 - Condições de hidrólise das proteínas de peito e coxa de frango, grau de hidrólise e umidade inicial dos hidrolisados.	70
Tabela 4.14 - Valores de constante de secagem, difusividade efetiva, umidade final e tempo de secagem para os hidrolisados de carne de frango.....	76
Tabela 4.15 - Composição proximal (b.u) dos hidrolisados protéicos de carne de frango.	78
Tabela 4.16 - Valores de solubilidade obtidos para os hidrolisados protéicos de carne de frango e para os músculos <i>in natura</i> em diferentes valores de pH.....	80
Tabela 4.17 – Valores de capacidade de retenção de água (CRA) obtidos para os hidrolisados protéicos de carne de frango e para os músculos <i>in natura</i> em diferentes valores de pH.	84
Tabela 4.18 – Valores de capacidades emulsificante obtidos para os hidrolisados protéicos de carne de frango e para os músculos <i>in natura</i> de peito e coxa de frango.	87
Tabela 4.19 – Valores de capacidade de retenção de óleo obtidos para os hidrolisados protéicos de carne de frango e para os músculos <i>in natura</i> de peito e coxa de frango.	91

Tabela 4.20 – Valores de capacidade de formação de espuma (CFE) dos hidrolisados protéicos e dos músculos <i>in natura</i> de peito e coxa de frango.	93
Tabela 4.21 – Estabilidade de espuma (EEs) formada pelos hidrolisados protéicos e pelos músculos <i>in natura</i> dos cortes de frango ao longo do tempo.	95
Tabela 4.22 - Digestibilidade <i>in vitro</i> dos hidrolisados de carne de frango e dos cortes <i>in natura</i>	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Classificação das peptídio hidrolases de acordo com seu mecanismo catalítico.	12
Figura 2.2 - Perfis de atividade em função do pH para alguma enzimas.	19
Figura 2.3 - Efeito da temperatura na atividade de uma enzima.	21
Figura 2.4 - Curva de secagem típica em condições constantes de secagem, teor de umidade livre em função do tempo.	29
Figura 2.5 - Curva de taxa de secagem típica em condições constantes de secagem, taxa (velocidade) de secagem em função do teor de umidade.	29
Figura 3.1: Fluxograma experimental da obtenção e caracterização do H.P.C.F (hidrolisado protéico de carne frango).	36
Figura 3.2 – Sistema utilizado para hidrólise enzimática.	37
Figura 4.1 - Efeitos da [S], da [E], do tempo e de suas interações no GH dos hidrolisados enzimáticos de peito (a) e coxa de frango (b) utilizando a enzima Alcalase.....	52
Figura 4.2 – Superfícies de resposta e suas respectivas curvas de contorno do grau de hidrólise (GH) em função da [S] e da [E] (a), da [S] e do tempo (b), [E] e do tempo (c) das proteínas de peito de frango com a enzima Alcalase	57
Figura 4.3 – Superfície de resposta e sua respectiva curva de contorno do grau de hidrólise em função da [S] e do tempo das proteínas de coxa de frango com a enzima Alcalase.	59
Figura 4.4 - Efeitos da [S], da [E], do tempo e de suas interações no GH dos hidrolisados enzimáticos de peito (a) e coxa de frango (b) utilizando a enzima Flavourzyme.	63
Figura 4.5 – Superfícies de resposta e suas respectivas curvas de contorno do grau de hidrólise (GH) em função da [S] e da [E] (a), da [S] e do tempo (b), [E] e do tempo (c) das proteínas de coxa de frango com a enzima Flavourzyme.....	67
Figura 4.6 – Curvas de taxa de secagem por m ² em função da umidade média dos hidrolisados de carne de frango com enzimas proteolíticas.....	71
Figura 4.7 – Curvas de adimensional de umidade em função do tempo de secagem dos hidrolisados de carne de frango com enzimas proteolíticas.....	72
Figura 4.8 – Curvas de adimensional de água livre em função do tempo de secagem dos hidrolisados de carne de frango com enzimas proteolíticas.	75
Figura 4.9 – Solubilidades dos hidrolisados e de peito e coxa de frango <i>in natura</i> em diferentes valores de pH.	81
Figura 4.10 - Capacidade de retenção de água dos hidrolisados e de peito e coxa de frango <i>in natura</i> em função do pH do meio.	85
Figura 4.11 – Capacidade emulsificante (%) apresentada pelos hidrolisados e pelo peito e coxa de frango <i>in natura</i>	89
Figura 4.12 – Estabilidade de espuma apresentada pelos hidrolisados protéicos e pelos músculos <i>in natura</i> dos cortes de frango ao longo do tempo.	96

LISTA DE NOMECLATURA

HPCF – Hidrolisado Protéico de Carne de Frango.

GH – Grau de Hidrólise.

[S] – Concentração de substrato.

[E] – Concentração de enzima.

t – tempo.

M – Massa.

U – Teor de umidade.

X – umidade livre remanescente.

X_m – Umidade média.

X_e – Umidade de equilíbrio.

X/X_o – Adimensional de umidade.

N – Taxa de secagem.

A – Área.

N_a – Taxa de secagem por m².

(X-X_e) / (X_o-X_e) – Adimensional de água livre.

K – Constante de secagem.

D_{ef} – Difusividade efetiva.

S – Solubilidade.

CRA – Capacidade de Retenção de Água.

CE – Capacidade Emulsificante.

CRO – Capacidade de Retenção de Óleo.

CFE – Capacidade de Formação de Espuma.

EES – Estabilidade de Espuma.

RESUMO

Enzimas proteolíticas são usadas para obter hidrolisados que possam ser usados como ingredientes funcionais em sistemas alimentícios. A hidrólise das proteínas alimentares possui uma longa história, principalmente as proteínas vegetais, do leite e de pescado. No entanto, pouco trabalho tem sido feito sobre a hidrólise de proteínas de carne de frango. Por essa razão, o objetivo deste trabalho foi à obtenção de hidrolisados enzimáticos de peito e coxa de frango, com diferentes graus de hidrólise e diferentes propriedades funcionais, utilizando as enzimas Alcalase e Flavourzyme. Para definir quais as variáveis do processo de hidrólise enzimática que influíam no grau de hidrólise das proteínas, realizou-se um planejamento fatorial 2^3 completo, para cada enzima e para cada corte de carne, variando a concentração de substrato [S] de 5 a 10% (p/v) em proteína, a concentração de enzima [E] de 4 a 8% em relação à massa total de proteínas, e o tempo (t) de hidrólise de 60 a 120 minutos, considerando como variável dependente o grau de hidrólise (GH) das proteínas. Os ensaios com a enzima Alcalase resultaram em valores de GH variando de 20,9 a 57,4% em peito de frango e de 18,6 a 38,8% em coxa de frango, enquanto os valores de GH variaram de 17,2 a 40,5% quando foi utilizado peito de frango como substrato e de 8,3 a 22,5% quando se utilizou coxa de frango como substrato, para a enzima Flavourzyme. As variáveis de processo estudadas apresentaram efeitos significativos no GH, em todos os casos, exceto a concentração de enzima na hidrólise de coxa de frango com Alcalase. Obtiveram-se modelos matemáticos preditivos a um nível de 5% de significância para as hidrólises com Alcalase em ambos os substratos, e para a enzima Flavourzyme em coxa de frango. Com base nos resultados do planejamento experimental, escolheram-se hidrolisados de baixo e alto GH, para ambos os substratos e ambas as enzimas, que foram submetidos a secagem e avaliados pelas suas propriedades de solubilidade, capacidade de retenção de água, capacidade emulsificante, capacidade de retenção de óleo, capacidade de formação de espuma, estabilidade de espuma e digestibilidade. Os hidrolisados obtidos com a enzima Alcalase apresentaram uma maior dificuldade para remoção de umidade durante o processo de secagem do que os hidrolisados com a enzima Flavourzyme, apresentando valores de constante de secagem (K) e difusividade efetiva (D_{ef}) entre $0,0092$ e $0,0125 \text{ min}^{-1}$ e $1,56 \times 10^{-9}$ e $2,11 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$. Os hidrolisados obtidos com a enzima Alcalase apresentaram maiores valores de solubilidade, capacidade de formação de espuma, estabilidade de espuma e de digestibilidade do que os hidrolisados obtidos com a enzima Flavourzyme, que apresentaram maiores valores de capacidade de retenção de água, propriedade emulsificante e capacidade de retenção de óleo. Estimou-se que as diferenças nos valores de grau de hidrólise foram decorrentes das diferenças na matéria-prima utilizada e no modo de atuação das diferentes enzimas proteolíticas. A diversidade de características dos hidrolisados demonstra o potencial de uso como ingredientes alimentícios.

Palavras-chave: frango; proteínas; enzimas; propriedades funcionais.

ABSTRACT

Proteolytic enzymes are used to obtain hydrolysates that can be used as functional ingredients in food systems. Hydrolysis of food protein has a long history, mainly for vegetable, milk and fish proteins. However, little work has been done on hydrolysis of chicken protein. For that reason, the objective of this work was the production of enzymatic hydrolysates with different degree of hydrolysis and different functional properties utilizing breast and thigh as substrate using two proteolytic enzymes, Alcalase and Flavourzyme. To define which process variables of the enzymatic hydrolysis would influence the protein degree of hydrolysis, an experimental design (factorial 2^3) for each enzyme and each meat cut was adopted, varying the substrate concentration [S] from 5 to 10% (w/v) protein-basis; enzyme concentration [E] from 4 to 8% (w/w) total protein-basis; and time (t) from 60 to 120min, considering as dependant variable, the degree of hydrolysis (%DH). The assays done with Alcalase resulted in degree of hydrolysis values varying from 20.9 to 57.4% for breast meat and from 18.6 to 38.8% for thigh meat, and from 17.2 to 40.5% when breast meat as substrate was utilized, and from 8.3 to 22.5% when thigh meat was used, for Flavourzyme assays. The process variables studies presented significant effects on the degree of hydrolysis, in all the study cases, except the enzyme concentration of the thigh meat hydrolysis with Alcalase. It was obtained predictive mathematical models and dimensional response surface relating the variables [S], [E] and (t) with %DH of chicken proteins. Taking the experimental design results in account, hydrolysates with low and high degree of hydrolysis were chosen for both substrates and both enzymes, that were submitted to a drying process and were evaluated for their functional properties of solubility, water holding capacity, emulsifying capacity, oil holding capacity, foam formation capacity, foam stability and *in vitro* digestibility. The Alcalase hydrolysates presented difficulty of the water removal when compared with the Flavourzyme hydrolysates, resulting in drying constant (K) and effective diffusivity (Def) values between 0.0092 and 0.0125 min^{-1} , and between 1.56×10^{-9} and 2.11×10^{-9} m^2/s , respectively. The Alcalase hydrolysates presented higher values of solubility, foam capacity, foam stability and digestibility, when compared with Flavourzyme hydrolysates, which presented higher values of water holding capacity, emulsifying capacity and oil holding capacity. It was considered that the differences between the degree of hydrolysis values was the consequence of the different raw materials utilized as substrate and the different activity and affinity for the substrate presented by the proteolytic enzymes. The diversity of characteristics and properties presented by the chicken protein hydrolysates shows a potential use of these products as food ingredients.

Key-words: Chicken; protein; enzyme; functional properties.

1. INTRODUÇÃO

A alta complexidade das moléculas de proteínas provavelmente é a principal responsável pelo menor conhecimento das transformações químicas a que as mesmas estão sujeitas no processamento e armazenamento dos alimentos (BOBBIO e BOBBIO, 1995). A modificação enzimática das proteínas utilizando preparados de enzimas proteolíticas selecionadas para cindir ligações peptídicas específicas é amplamente utilizada na indústria de alimentos (MULLALLY *et al.*, 1994).

A adição de enzimas para hidrolisar as proteínas dos alimentos é um processo reconhecido por melhorar ou modificar as propriedades físico-químicas, funcionais e sensoriais das proteínas iniciais sem prejudicar o seu valor nutritivo (GONZALES-TELLO *et al.*, 1994). As enzimas utilizadas nas indústrias de alimentos e nas pesquisas científicas, predominantemente são hidrolases, a maioria carboidratases, seguido das proteases e lípases (LAHL e BRAUN, 1994). Estudos comprovaram que enzimas proteolíticas produzem melhores resultados retendo o valor nutricional dos alimentos (SILVA *et al.*, 1999), porém a qualidade do produto varia com a natureza da enzima e as condições de processamento (SIMPSON *et al.*, 1998).

A hidrólise de proteínas pode ser realizada com enzimas, ácidos ou álcali, mas a hidrólise enzimática é mais indicada que métodos químicos rigorosos para a produção de hidrolisados com aplicações nutricionais. O processo de se adicionar enzimas ao invés de reagentes químicos ou de aproveitar enzimas endógenas oferece muitas vantagens por que ele permite o controle da hidrólise melhorando as propriedades do produto final. Além disso, o processo de hidrólise enzimática é mais simples, eficiente e envolve condições alcalinas moderadas que não destroem as proteínas recuperadas por racemização e outras reações químicas (FONKWE e SINGH, 1996).

A hidrólise de proteínas pode ser produzida com dois objetivos, alteração das propriedades funcionais e produção de pequenos peptídeos e aminoácidos para serem utilizados em alimentos dietéticos ou como agente flavorizante (ROMAN e SGARBIERI, 2005). A proteína hidrolisada tem sido usada desde 1940 para administração nutricional de indivíduos que não podem digerir a proteína intacta (MAHMOUD *et al.*, 1992). A hidrólise altera química, física, biológica e imunologicamente as propriedades das proteínas. (CORDLE, 1994). Os hidrolisados protéicos são produzidos para uma grande variedade de usos na indústria de alimentos, incluindo substitutos lácteos, suplementos protéicos, estabilizadores de

bebidas, realçadores de sabor e produtos de confeitaria (KRISTINSSON e RASCO, 2000^a).

A hidrólise de proteínas de alimentos vem sendo realizada por muitas razões, incluindo melhores características nutricionais, deterioração retardada, conferindo textura, elevando ou reduzindo a solubilidade, adicionando propriedades de formação de espuma ou coagulação, adicionando capacidade emulsificante, prevenindo interações indesejáveis, removendo off-flavors e odores e removendo ingredientes tóxicos ou inibidores (LAHL e BRAUN, 1986). A proteína hidrolisada possui um número de propriedades funcionais que a torna atraente como fonte de proteína para nutrição humana, para uso em produtos médicos especiais e para uso em produtos alimentícios em geral (FROKJAER, 1994).

Existe ampla divulgação científica sobre hidrolisados de pescado e outras matérias-primas (ABDUL-HAMID *et al.*, 2002; BAEK e CADWALLADER, 1995; CÂNDIDO e SGARBIERI, 2003; DINIZ e MARTIN, 1997; FONKWE e SINGH, 1996; GOVINDARAJU e SRINIVAS, 2006; HOCKOVÀ *et al.*, 2002; KRISTINSSON e RASCO, 2000^b) no entanto, escassa em relação às proteínas de frango. Como o Brasil tornou-se um dos principais produtores de carne de frango do mundo, com uma produção de anual de aproximadamente 10 milhões de toneladas, o estudo do comportamento de enzimas proteolíticas sobre as proteínas desta matéria-prima e a comparação com as de pescado, contribuirá com o conhecimento necessário para promover novas tecnologias aplicadas tanto a cortes nobres como a resíduos da industrialização, para obtenção de novos produtos com diferentes propriedades funcionais.

Os objetivos deste trabalho foram:

- Obter hidrolisados enzimáticos de peito e coxa de frango com diferentes graus de hidrólise utilizando enzimas proteolíticas de diferentes atividades, estudando o comportamento destas enzimas visando definir quais as variáveis do processo de hidrólise enzimática (concentração de substrato, concentração de enzima, e tempo) apresentam efeitos significativos no processamento.
- Estudar o comportamento dos hidrolisados obtidos de baixo e alto grau de hidrólise referente ao processo de secagem pelo levantamento de curvas de cinética de secagem e determinação dos parâmetros de secagem (constante de secagem e difusividade efetiva).
- Caracterizar os hidrolisados protéicos obtidos de baixo e alto grau de hidrólise pelas suas propriedades funcionais e nutricionais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mercado de Carne de Aves

O consumo mundial de carne de frango duplicou nos últimos 15 anos, porém esta revolução gastronômica não foi casual. Fatores tão diversos como a elevada velocidade de crescimento da ave, o seu menor custo de produção comparativamente ao de outras espécies animais, um preço acessível para o consumidor, assim como as suas características dietéticas (alto valor nutricional) e culinárias, que reúnem perfeitamente os requisitos alimentícios da sociedade moderna, levaram este tipo de carne a um lugar preferencial entre a procura do consumidor (NANTA, 2006).

Atualmente a indústria avícola está grandemente integrada e mantida por grandes corporações. Com o passar dos anos a indústria avícola vem crescendo e se especializando em raças de cortes e de produção de ovos (BARBUT, 2002). O Brasil é um dos principais produtores e exportadores mundiais de carne de frango. Tendo em vista a alta competitividade existente nos mercados interno e externo, todos os segmentos envolvidos precisam estar atentos à qualidade dos produtos produzidos (SOUZA, 2005). Através da Tabela 2.1 podemos observar a constante evolução da produção de carne de frango no Brasil nos últimos cinco anos, segundo a ABEF (Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango).

Tabela 2.1 – Produção Brasileira de Carne de Frango.

Ano	Mercado Interno	Exportação	Total	Ano	Mercado Interno	Exportação	Total
1989	1.811.396	243.891	2.055.287	1998	4.262.231	612.477	4.874.708
1990	1.968.069	299.218	2.267.358	1999	4.755.492	770.551	5.526.044
1991	2.200.211	321.700	2.521.911	2000	5.069.777	906.746	5.976.523
1992	2.350.567	371.719	2.726.992	2001	5.486.408	1.249.288	6.735.696
1993	2.709.500	433.498	3.142.998	2002	5.917.000	1.599.923	7.516.923
1994	2.929.997	481.029	3.411.026	2003	5.920.908	1.922.042	7.842.950
1995	3.616.705	428.988	4.050.449	2004	6.069.334	2.424.520	8.493.854
1996	3.482.767	568.795	4.051.561	2005	6.535.185	2.761.966	9.297.151
1997	3.811.569	649.357	4.460.925	2006	6.622.587	2.712.959	9.335.546

Fonte: ABEF - Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango (2007).

2.2 Proteínas

As proteínas são polímeros com peso molecular variando de aproximadamente 10.000 até vários milhões de kilodaltons, sendo geralmente descritas em referência a

sua estrutura altamente complexa. As unidades monoméricas que compõem as proteínas, os aminoácidos, são unidas por um único tipo de ligação, a ligação peptídica, e a quantidade de aminoácidos diferentes é estritamente limitada em número e essencialmente comum a todas as proteínas. As propriedades e as funções de um tipo particular de proteína dependem inteiramente da seqüência particular de seus aminoácidos (COULTATE, 2004).

As proteínas são nutrientes essenciais aos organismos animais e humano, devendo estar presentes na alimentação em quantidades adequadas. Além do aspecto quantitativo, deve-se levar em conta o aspecto qualitativo das proteínas, ou seja, seu valor nutritivo (SGARBIERI, 1996). Segundo este autor, as proteínas fornecem aminoácidos, que são os elementos que as compõem, são usados para formação de músculos e outros componentes do corpo que contém proteínas, incluindo imunoglobulinas, albuminas, enzimas e hormônios. O organismo sintetiza aminoácidos não essenciais, enquanto que outros precisam ser fornecidos por fontes alimentares. As proteínas e outros compostos contendo nitrogênio são constantemente degradados e reconstruídos. Todas essas perdas devem ser repostas por um suprimento contínuo de aminoácidos fornecidos pela dieta.

Possivelmente as transformações físico-químicas das proteínas sejam as alterações mais importantes nos alimentos. Assim, por exemplo, a desnaturação ainda que não afete a digestibilidade das proteínas pode resultar em alterações da solubilidade, da retenção de água, da capacidade de participar de emulsões e pode também produzir um aumento da reatividade química da proteína por exposição de mais grupos reativos da cadeia protéica (como -SH), que estão protegidos na proteína natural pelas estruturas quaternárias, terciárias e secundárias da molécula e que são alteradas pela desnaturação (BOBBIO e BOBBIO, 1995).

2.2.1 Proteínas do músculo animal

A carne oriunda de qualquer espécie é considerada uma fonte de “proteína completa”, de excelente qualidade e de alto valor biológico, pois contém alta porcentagem de todos os aminoácidos essenciais ao corpo humano. A disponibilidade dos aminoácidos da carne após a digestão é alta, as proteínas cárneas são 95 a 100% digeríveis (OLIVO e OLIVO, 2006).

2.2.2 Proteínas da carne de aves

As proteínas representam blocos estruturais que formam os músculos. A proteína consiste em cerca de 18-20% do peso do músculo magro da ave, onde água e gordura representam cerca de 75% e 5% respectivamente. A proteína muscular pode ser dividida em três grupos principais (Tabela 2.2), baseados no conteúdo de água e na solubilidade (BARBBUT, 2002).

Tabela 2.2 - Principais proteínas do músculo de aves divididas em três grupos de acordo com a solubilidade e a porcentagem relativa no músculo úmido (baseado em 19% de proteína total).

Grupo	Denominação	(%)
Sarcoplasmáticas		(5.5)
	Mioglobina	0.2
	Hemoglobina	0.6
	Citocromo	0.2
	Enzimas glicolíticas	2.2
	Creatina quinase	0.5
Miofibrilares		(11.5)
	Miosina	5.5
	Actina	2.5
	tropomiosina	0.6
	Troponina	0.6
	C-Proteína	0.3
	α -Actina	0.3
β -Actina	0.3	
Estroma		(2.0)
	Colágeno	1.0
	Elastina	0.05
	Mitocondrial	0.95

Fonte: BARBBUT, 2002.

As proteínas sarcoplasmáticas são solúveis em água e são distribuídas dentro do fluido celular (sarcoplasma). Essas proteínas sarcoplasmáticas consistem em cerca de 25% da proteína total do músculo (BARBBUT, 2002). Trata-se de cerca de 50 componentes, essencialmente enzimas e mioglobina. A alta viscosidade do sarcoplasma se deve a alta concentração de proteínas dissolvidas, que chega a ser de 20-30% (BELITZ e GROSCH, 1997).

As proteínas miofibrilares consistem em cerca de 55% da proteína total do músculo e são solúveis em soluções salinas. São conhecidas cerca de 20 proteínas miofibrilares diferentes. As mais abundantes são a miosina e a actina. O resto são as proteínas tropomiosina e troponina, importantes para a contração, e distintas proteínas do citoesqueleto, que contribuem para a estabilização do sarcômero (BELITZ e GROSCH, 1997).

As proteínas do estroma são insolúveis em água e soluções salinas, consistem em cerca de 10-15% da proteína total do músculo, incluem principalmente as proteínas do tecido conjuntivo. As duas principais proteínas são o colágeno e a elastina. No músculo vivo, elas formam vários componentes estruturais, incluindo membranas ao redor das células, de músculos empacotados, de músculos, também formando parte de ligamentos e tendões (BARBBUT, 2002).

2.2.3 Estrutura miofibrilar do músculo animal

As miofibrilas são compostas por feixes de filamentos protéicos arranjados. Os filamentos protéicos são compostos, sobretudo, pela proteína actina, juntamente com quantidades menores de tropomiosina e troponina. Os filamentos grossos são agregados de miosina, uma proteína grande (peso molecular de 5×10^5) e alongada (COULTATE, 2004).

Existem mais de 20 diferentes proteínas que compõem as miofibrilas. Seis destas proteínas constituem 90% do total. Estas seis, em ordem decrescente de abundância são: miosina, actina, titina, tropomiosina, troponina e nebulina (OLIVO E OLIVO, 2006). A unidade fundamental da carne é o sarcômero miofibrilar, que contém as duas proteínas musculares mais importantes, a actina e a miosina, que apresentam aproximadamente 65% da massa seca total do sarcômero, formado por uma série de filamentos longitudinais de actina e miosina (ROBINSON, 1991).

A miosina é uma proteína grande e complexa de peso molecular de 500.000, tem a forma de uma bastão com 20 nm de comprimento. As cadeias protéicas são enroladas entre si em forma de hélice. Numa das extremidades, a miosina apresenta uma saliência globular, ou cabeça, formada por grupos SH (FURLONG, 2000). É uma proteína de natureza fibrosa e seu ponto isoelétrico é no pH de 5,4. É caracterizada pelo alto teor de aminoácidos básicos, tornando-a uma molécula altamente carregada. Assim, as moléculas de miosina se unem espontaneamente em filamentos, em soluções de força iônica e pH fisiológicos (OLIVO E OLIVO, 2006).

A actina encontra-se sob duas formas: uma globular, actina-G, de peso molecular de 50 a 60.000; e outra fibrosa, actina-F, resultante da polimerização da primeira em filamentos constituídos em cadeias enroladas de dupla hélice que compreendem cada uma 300 a 400 monômeros (CHEFTEL & CHEFTEL, 1976). O ponto isoelétrico da actina G em soluções de baixa força iônica é de aproximadamente pH 4,7. À medida que a força iônica aumenta até o nível fisiológico a actina-G se polimeriza em uma forma fibrosa denominada de actina-F (OLIVO E OLIVO, 2006). Com respeito à hidrólise protéica, as proteínas miofibrilares miosina e actina estão sujeitas a clivagem enzimática por enzimas proteolíticas (KRISTINSSON e RASCO, 2000^a).

No comércio de carne de aves existe uma clara distinção entre carne branca e escura. A carne branca refere-se ao músculo do peito de frango e peru, enquanto a carne escura refere-se a carne da coxa, também pode ser dito que isto está relacionado com a proporção relativa de fibras vermelhas e brancas dentro do músculo. No geral, a maioria dos músculos contem uma mistura de fibras vermelhas e brancas, poucos músculos são compostos somente de fibras vermelhas ou somente de fibras brancas (BARBUT, 2002). A Tabela 2.3 apresenta as principais diferenças entre as fibras vermelhas e brancas.

Tabela 2.3 – Comparações relativas entre fibras musculares vermelhas e brancas em aves.

	Fibra Vermelha	Fibra Branca
Mioglobina (concentração)	Alta	Baixa
Cor	Vermelha	Branca
Velocidade de contração	Lenta	Rápida
Mitocôndrias (número)	Alto	baixo
Mitocôndrias (tamanho)	Grande	Pequeno
Conteúdo de glicogênio	Baixo	Alto
Atividade glicolítica	Baixa	Alta
Conteúdo lipídico	Alto	Baixo
Metabolismo oxidativo	Alto	Baixo
Diâmetro das fibras	Pequeno	Grande

Fonte: BARBUT, 2002.

2.2.4 Colágeno

O colágeno é o constituinte principal do tecido conjuntivo do músculo e sem dúvida representa a proteína animal mais abundante. Também é encontrado na pele e nos ossos. O colágeno mantém unidas as fibras musculares e contém cerca de 30% de glicina e 25% de prolina e hidroxiprolina (CHEFTEL & CHEFTEL, 1976). O colágeno possui alta proporção de glicina e prolina e a presença de 4-hidroxiprolina e 5-hidroxilisina. Sendo que a existência de hidroxiprolina é exclusiva do tecido conjuntivo, sua determinação se utiliza para calcular a proporção deste tecido em produtos cárnicos (BELITZ e GROSCH, 1997).

Nos tecidos de mamíferos e de aves as fibras de colágeno conferem força aos tendões e rigidez aos ossos durante seu desenvolvimento e, ainda que a proporção de colágeno intramuscular seja pequena (aproximadamente 2%), as fibras de colágeno formam uma estrutura laminada ao longo de todo o endomísio (fios estreitos de tecido conjuntivo que envolve cada fibra), fazendo com que o colágeno contribua de forma significativa na textura da carne (ROBINSON, 1991).

O colágeno forma pontes cruzadas entre as suas moléculas, tornando-a relativamente insolúvel e de alta força de tensão. Esta característica influencia na maciez da carne. Em animais jovens o número de pontes cruzadas é menor. Com o aumento da idade aumenta também o número de pontes. Por esta razão, animais mais velhos apresentam carnes menos macias (OLIVO E OLIVO, 2006).

Há duas classes de enzima que degradam o colágeno. O primeiro tipo corresponde as colagenosas e proteinases neutras, ativas a pH fisiológico e capazes de catalisar a hidrólise das fibras de colágeno da carne. O outro grupo de enzimas capazes de degradar o colágeno são várias endo e exoproteinases lisossomais (ROBINSON, 1991).

2.2.5 Elastina

Esta proteína é bem menos abundante no músculo. As fibras são facilmente esticadas, sendo que o seu ponto de quebra é de aproximadamente 150% de seu comprimento original. Após serem esticadas, as fibras voltam ao seu tamanho original. Isto é atribuído ao seu alto teor de aminoácidos não polares e as ligações intermoleculares que agregam quatro cadeias vizinhas de elastina entre moléculas de lisina (OLIVO e OLIVO, 2006).

Normalmente a elastina se encontra na forma amorfa e relaxada, diferentemente do colágeno, ela não exerce forças de tensão sobre as fibras musculares. As fibras de elastina são filamentosas e sua espessura e distribuição varia segundo o tecido. Junto com o colágeno, são as únicas proteínas conhecidas que possuem ligações entrecruzadas derivadas de lisina (ROBINSOSN, 1991. CHEFTEL e CHEFTEL, 1976). A elevada hidrofobicidade e a conseqüente insolubilidade da lisina fazem com que esta proteína seja resistente a degradação enzimática. No entanto, tem-se identificado certo número de elastases que são serina proteases (ROBINSON, 1991).

2.3 Enzimas

Enzimas são catalisadores bioquímicos vitais para todos os seres vivos, porque elas aceleram as reações químicas entre constituintes orgânicos dentro das células, que caso contrário levaria um tempo extremamente longo para completar. Na ciência e tecnologia de alimentos, as enzimas são exploradas para realizar funções desejáveis e para facilitar a conversão de matérias-primas em alimentos de alta qualidade. Os processos biológicos que usam enzimas adicionadas são empregados com muita freqüência, e a hidrólise enzimática apresenta-se como a mais promissora, pois resulta em produtos de alta funcionalidade e alto valor nutritivo (LAHL e BRAUN, 1994).

2.3.1 Classificação

De acordo com o sistema de nomenclatura e classificação de enzimas, adotado por acordo internacional (*Enzyme Commission*, EC), cada enzima recebe um número classificatório (número EC) composto por quatro dígitos separados por pontos. O primeiro dígito indica uma das seis classes em que são divididas as enzimas, de acordo com a reação que catalizam: 1-oxidoreduases (reações de oxido-redução), 2-transferases (reações de transferência de grupos entre moléculas, que não sejam catalisadas pelas oxidoreduases ou pelas hidrolases), 3-hidrolases (reações de hidrólise, onde a água é o receptor dos grupos transferidos) 4-liases (reações de eliminação e adição de grupos, formando ou desfazendo ligações duplas), 5-isomerases (reações de isomerização) e 6-ligases (catálise de ligação de duas moléculas com hidrólise simultânea de ATP).

O segundo e terceiro dígito (subclasse e sub-subclasse, respectivamente) indicam diferentes situações, dependendo da classe que se encontram. Por exemplo, nas oxirredutases (classe 1) a subclasse indica a natureza do grupo sobre o qual as enzimas atuam (álcool, aldeído, cetona, ou outro) e a subclasse indica o tipo de receptor envolvido (citocromo, oxigênio ou outro); nas transferases (classe 2) a subclasse indica a natureza do grupo transferido (carbono, aldeído, acil, ou outro) e a sub-subclasse subdivide o tipo de grupo transferido (se o grupo carbono é um grupo metil ou hidroximetil, por exemplo) ou indica o tipo de receptor, no caso da enzima tratar-se de uma fosfotransferase. O quarto dígito corresponde ao número serial de cada enzima. Segundo esta ordem cada enzima estará perfeitamente classificada (BELITZ e GROSCH, 1997; KENNEDY, 1987 ; WHITAKER, 1994). Por exemplo, a enzima ascórbico-oxidase (EC 1.10.3.3) catalisa a reação:



EC = Enzyme Commission

1 = Oxirredutase

10 = Subclasse (indicação do doador: ácido ascórbico)

3 = Sub-subclasse (indicação do acceptor: oxigênio)

3 = Número de série da enzima dentro da sub-subclasse

2.3.2 Usos Industriais

O uso de enzimas em processos industriais pode eliminar freqüentemente o uso de temperaturas altas, solventes orgânicos e extremos de pH, enquanto ao mesmo tempo oferece especificidade de reação aumentada, pureza de produto e impacto ambiental reduzido. O crescente uso de enzimas industriais é dependente da constante inovação, melhor performance e custo reduzido. Esta inovação é dirigida rapidamente por um crescente banco de dados de diversas enzimas naturais, DNA recombinante e tecnologias de fermentação que permitem produzir esta diversidade de enzimas a baixo custo, e ferramentas de modificação de proteínas que habilitam enzimas a se tornarem afinadas, ajustando-se ao mercado industrial (CHERRY e FIDANTSEF, 2003).

As enzimas utilizadas nas indústrias de alimentos e nas pesquisas científicas, predominantemente são hidrolases, a maioria carbohidratases, seguido das proteases e lípases. As proteases são enzimas melhores caracterizadas, e mais importantes do

ponto de vista econômico, e o seu uso na indústria de alimentos está bem estabelecido. A escolha da enzima é normalmente determinada pela combinação entre eficácia e economia. A seleção da enzima ou mistura de enzimas está baseada frequentemente na sua habilidade de hidrolisar o substrato na extensão desejada.(LAHL e BRAUN, 1994). De acordo com este autor, quimiotripsina e tripsina são específicas para clivar a ligação arginina-lisina. As enzimas papaína, ficina e bromelina são comparativamente não seletivas, enquanto enzimas microbianas tendem a ser mais seletivas.

Proteases de detergente, que consistem em proteases alcalinas bacterianas como a subtilisina, representa o volume maior de enzimas vendidas para uso industrial, pois respondem por até 35% do mercado de enzima industrial total. Outras aplicações de protease incluem carne e soja processadas, laticínios, tratamento de couro, tratamento de águas residuais e para síntese orgânica (CHERRY e FIDANTSEF, 2003).

A hidrólise de proteínas alimentares se dá por várias razões, incluindo características de melhoramento nutricional, retardo da deterioração, aumento ou diminuição da solubilidade, aumento de propriedades espumantes ou coagulantes, aumento da capacidade emulsificante, prevenção de interações indesejáveis, remoção de sabores ou odores e ingredientes tóxicos ou inibidores (LAHL e BRAUN, 1994).

2.3.3 Enzimas proteolíticas

As enzimas proteolíticas, proteases ou proteinases pertencem ao grupo das hidrolases as quais tem em comum o envolvimento da água na formação do produto. As proteinases catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas, ocorrendo à transferência de componentes do substrato para a água. Estas enzimas podem ter origem animal, vegetal ou microbiana (WHITAKER, 1994).

As proteases são classificadas pelo mecanismo de hidrólise em endoproteinases e exopeptidases. As endoproteinases hidrolisam as ligações peptídicas dentro da molécula protéica, geralmente em resíduos específicos produzindo peptídeos relativamente grandes. As exopeptidases removem aminoácidos sistematicamente a partir do nitrogênio terminal, chamadas aminopeptidases ou do carbono terminal, chamadas carboxipeptidases, estas hidrolisam as ligações peptídicas terminais. Na hidrólise de alimentos, são normalmente utilizadas as endoproteinases, sendo ocasionalmente combinadas com exopeptidases para atingir a

degradação mais completa das proteínas. A hidrólise enzimática das proteínas é um processo complexo devido ao grande número de ligações peptídicas com acesso específico para as reações enzimáticas (KRISTINSSON e RASCO, 2000).

WARD (1985), citado por TARDIOLI (2003), reportou que segundo o sistema internacional de nomenclatura, as enzimas proteolíticas pertencem a subclasse 4 da classe 3 (EC 3.4 Peptídio hidrolases) conforme mostra a Figura 2.1. As proteases são subdivididas em sub-subclasses com base nos seus mecanismos catalíticos, as enzimas em cada sub-subclasse são distinguidas em sua especificidade pelo substrato.

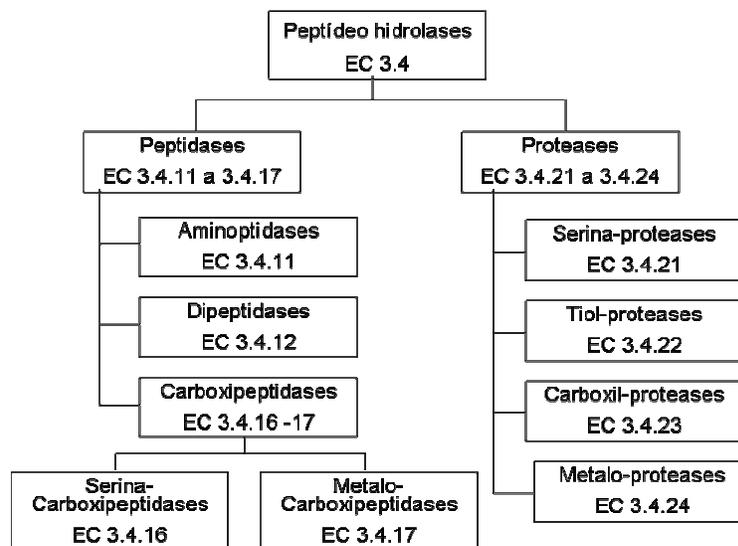


Figura 2.1 – Classificação das peptídeo hidrolases de acordo com seu mecanismo catalítico (Ward, 1985).

Segundo BELITZ e GROSCH (1997) uma nova divisão se formou em relação aos grupos existentes no centro ativo das enzimas. De acordo com WHITAKER (1994), é conveniente dividir as enzimas proteolíticas em quatro grupos, com base no seu mecanismo catalítico de ação. Os nomes dos grupos servem para indicar um dos importantes grupos catalíticos do sítio ativo. Os quatro grupos são: serina-proteases, tiol ou cisteína proteases, metalo-proteases e carboxil-proteases ou proteases ácidas.

2.3.4 Alcalase e Flavourzyme

A Alcalase é uma enzima produzida por fermentação submersa do microrganismo *Bacillus licheniformis* e desenvolvida pela Novo Nordisk (Bagsvaerd,

Denmark) para a indústria de detergentes. Tem sido provado repetidamente por muitos pesquisadores ser a melhor enzima usada na preparação de hidrolisados protéicos de pescado e outros hidrolisados protéicos (KRISTINSSON e RASCO, 2000).

De acordo com a Novo Nordisk, a Alcalase, classificada como uma subtilisina (EC 3.4.21.62), é uma serina-protease, caracterizada pelo seu desempenho a altas temperaturas e moderada alcalinidade (NOVO, 1994). Embora a Alcalase venha sendo amplamente utilizada em várias aplicações em biotecnologia, sua especificidade não foi completamente caracterizada. Sabe-se que essa enzima hidrolisa principalmente ligações peptídicas contendo resíduos hidrofóbicos no lado carboxílico (Adler-Nielsen, 1986).

A Flavourzyme é uma protease fúngica complexa produzida pela fermentação submersa de uma linhagem selecionada de *Aspergillus oryzae* o qual não foi geneticamente modificado, sendo utilizada na hidrólise sob condições neutras ou ligeiramente ácidas (SLIZYTE *et al*, 2004). A Flavourzyme é uma mistura de proteases que contém ambas as atividades, endoproteinase e exopeptidase. Em alimentos protéicos hidrolisados, a aplicação de endoproteinases é dominante. Ocasionalmente, as endoproteinases são combinadas com exopeptidases para completa degradação (NILSANG *et. al*, 2004).

HRCKOVA *et al* (2002) hidrolisaram enzimaticamente farinha de soja desengordurada e observaram uma diferença significativa na distribuição de aminoácidos entre os hidrolisados tratados com Alcalase e os tratados com Flavourzyme. Como a Flavourzyme possui ambas as atividades, endoprotease e exopeptidase, sua habilidade para liberar mais aminoácidos livres é maior do que no caso com a Alcalase. Esses autores ressaltam que a eficiência da protease é um fato relevante para a produção de hidrolisados protéicos e como a escolha da protease usada determina as propriedades funcionais e nutricionais, que é de grande importância para a aplicação do hidrolisado protéico.

Preparações de proteinases disponíveis comercialmente foram estudadas por SMYTH e FITZGERALD (1998), estes autores verificaram um alto nível de atividade de subtilisina presente na Alcalase. Esses pesquisadores também observaram que hidrolisados produzidos com a Flavourzyme podem apresentar um bom sabor devido ao efeito de sua atividade exopeptidase não produzir um sabor amargo e que estes hidrolisados podem não ser satisfatórios para fortificação protéica de produtos alimentícios de baixa osmolalidade devido ao alto nível de aminoácidos livres. A tabela 4 apresenta um sumário de detalhes e características de proteases comerciais.

Tabela 2.4 - Sumário de detalhes e características fornecido pelos fabricantes de preparados de proteases disponíveis comercialmente.

Preparado Enzimático	Fonte	Tipo de atividade	Determinação da atividade	Faixa de pH	Faixa de Temperatura	Número EC	Forma
Protamex	<i>Bacillus</i>	Subtilisina e proteinase neutra	Método Anson utilizando hemoglobina como substrato	5,5 - 7,5	-	3.4.21.62 (Subtilisina) 3.4.24.28 (Neutral Protease)	Granulada
Alcalase 0.6 L	<i>Bacillus licheniformis</i>	Endoproteinase (Subtilisina Carlsberg)	Método Anson utilizando hemoglobina como substrato	6,5 - 8,5	55 - 70°C	3.4.21.62 (Subtilisina)	Líquida
Neutrase	<i>Bacillus subtilis</i>	Metallo-proteinase (Zn) neutra	Método Anson utilizando hemoglobina como substrato	5,5 - 7,5	45 - 55°C	3.4.24.28 (Neutral Protease)	Líquida
Neutral Protease	<i>Bacillus subtilis</i>	Endoproteinase	Método de Folin utilizando caseína como substrato	5,5 - 8,0	45 - 60°C	-	Pó
Corolase 7092	<i>Aspergillus</i>	Endoproteinase/ Exopeptidase	Método Anson utilizando hemoglobina como substrato	5,5 - 9,5	45 - 55°C	-	Líquida
Fungal Protease	<i>Aspergillus oryzae</i>	Endoproteinase	Método Anson utilizando hemoglobina como substrato	4,0 - 7,0	40 - 60°C	-	Pó
Flavourzyme	<i>Aspergillus oryzae</i>	Endoproteinase (enzima complexa)/ exopeptidase	Método de Folin utilizando proteína isolada de soja como substrato/ Leucina-p-nitroanilida	5,0 - 7,0	45 - 50°C	3.2.11.11 (Aminopeptidase)	Pó
PTN 3.0S	Porcina pancreática	Tripsina	Método Anson utilizando hemoglobina como substrato	6,0 - 9,0	40 - 55°C	3.4.21.4 (Tripsina) 3.4.21.1 (Quimiotripsina)	Pó
PTN 3.0 S	Porcina pancreática	Tripsina	Método Anson utilizando hemoglobina como substrato	6,0 - 9,0	40 - 55°C	3.4.21.4 (Tripsina) 3.4.21.1 (Quimiotripsina)	Granulada

Fonte: SMYTH e FITZGERALD, 1998.

2.4 Hidrolisados Protéicos

Os hidrolisados protéicos vêm sendo utilizados desde 1940 com finalidades médicas na preparação de dietas especiais para alimentação enteral de bebês e para manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir proteínas. Na década de 70 assistiu-se um expressivo crescimento nos métodos de preparação e uso de hidrolisados protéicos, tanto com finalidades clínica e nutricional como para a melhoria de propriedades funcionais de proteínas e alimentos de base protéica. A hidrólise enzimática de polímeros em alimentos, como por exemplo, de proteínas, é um processo de considerável importância que tem sido utilizado para melhorar propriedades físicas, químicas e funcionais dos alimentos, sem prejudicar seu valor nutritivo, melhorando, particularmente, as características de absorção das proteínas (PACHECO et al., 2005).

Os hidrolisados podem ser definidos como proteínas cindidas química ou enzimaticamente que produzem peptídeos de diferentes tamanhos. Ainda que a produção de hidrolisados já tenha se estendido pelo mundo inteiro, o controle apropriado do processo e mecanismo exato da hidrólise protéica, na maioria dos casos não está completamente compreendido (KRISTINSSON e RASCO, 2000^a). Estes autores ainda ressaltam que a hidrólise química das proteínas é alcançada pela quebra das ligações peptídicas tanto com ácido ou base. Mas, no entanto, existem várias limitações para ingredientes alimentícios elaborados por este método. A hidrólise química tende a ser um processo difícil de controlar e quase sempre leva a produtos com composição química e propriedades funcionais variáveis. O hidrolisado protéico com reagentes químicos fortes e solventes é produzido a temperaturas e pH extremos e geralmente obtêm-se produtos com qualidade nutricional reduzida, pobres em funcionalidade.

A hidrólise com enzimas é mais indicada para a produção de hidrolisados com aplicações nutricionais, que com métodos químicos rigorosos. A hidrólise enzimática pode produzir hidrolisados com perfil de peptídeos bem definido, enquanto que as hidrólises ácida e alcalina podem destruir L-aminoácidos, produzindo D-aminoácidos e ainda formar substâncias tóxicas como a lisina-alanina. Isso é especialmente crítico em hidrolisados protéicos, onde proporções de aminoácidos, dipeptídeos e tripeptídeos são importantes para a absorção pelo organismo (LAHL e BRAUN, 1994).

O processo hidrolítico e as condições de reação diferem entre diferentes enzimas e substratos utilizados e também depende das propriedades desejadas para

o hidrolisado. A temperatura e o pH do processo são normalmente ajustados para otimizar a cinética da enzima ou mistura de enzimas selecionadas. Uma protease comercial é adicionada em varias concentrações dependendo da taxa de hidrólise necessária. Dada uma determinada enzima e um substrato em particular, qualquer processo de hidrólise envolve pelo menos cinco variáveis independentes. Estas são pH, temperatura, proporção enzima/substrato, concentração do substrato protéico em % ou unidades de atividade por kg, e tempo (KRISTINSSON e RASCO, 2000^a).

2.4.1 Hidrolisados protéicos de carne de aves

A hidrólise enzimática de carne de aves é pouco mencionada na literatura científica. BURICA e VITEZ (1981), citado por SURÓWKA e FIK (1992) descreveram a produção de hidrolisados de músculo de frango tratados com bromelina, onde o produto obtido apresentava boa qualidade e continha 14-14,8% de nitrogênio. STANLEY (1981), também citado por este mesmo autor, hidrolisou carne de frango usando pancreatina e, observou uma maior intensificação do gosto no produto hidrolisado. Autores japoneses (ISHIDA e YAMAMOTO, 1976; ISHIDA et al., 1979) mostraram, como resultado de proteínas sarcoplasmáticas de aves, um produto que possuía gosto desejável, enquanto que a fração miofibrilar apresentava gosto amargo. Além disso, eles observaram que o hidrolisado de carne de ave estaria livre do gosto amargo quando utilizavam enzimas que possuíam ambas as atividades, endo e exopeptidase.

SURÓWKA e FIK (1992) otimizaram as condições para hidrólise de proteínas contidas em cabeças de frango usando Neutrase de *Bacillus subtilis*, como também avaliaram a composição, a qualidade e algumas propriedades físico-químicas do produto final. O produto final apresentou um conteúdo de 78,1% de proteína total, excelente solubilidade e uma boa capacidade de emulsificação e estabilidade de emulsão.

FONKWE e SINGH (1996) investigaram a produção de um hidrolisado enzimático de proteínas de resíduos de carne de peru mecanicamente separada usando papaína como enzima, e caracterizaram o hidrolisado de acordo com suas propriedades físico-químicas e funcionais. Estes autores relataram em seu estudo que a hidrólise enzimática demonstrou ser um método efetivo de recuperar proteínas de resíduos de carne de peru mecanicamente separada, onde o produto final apresentou um rendimento alto de proteína recuperada e uma excelente solubilidade em água,

sendo que este tipo de hidrólise também tem a vantagem de que ambas as proteínas colagenosas e não-colagenosas eram hidrolisadas, o que difere da extração alcalina de proteínas que hidrolisa principalmente proteínas não-colagenosas.

SILVA *et al* (1999) estudaram a composição de hidrolisados obtidos de carne de boi, peru e galinha utilizando suco de abacaxi como fonte de bromelina e obtiveram um hidrolisado de baixo custo, com elevado valor nutricional que poderia ser aplicado em todos os tipos de dietas alimentares.

2.5 Grau de Hidrólise (GH)

De acordo com GILDBERG (1992), hidrolisados para aplicação em alimentos devem ser preparados com o controle adequado da hidrólise a fim de segurar bom sabor e propriedades funcionais adequadas. ADLER-NISSEN (1984), citado por LEE *et al.* (2000), introduziram o conceito de grau de hidrólise (GH) para controlar o sabor amargo das proteínas parcialmente hidrolisadas. O grau de hidrólise é uma medida da extensão da degradação hidrolítica da proteína. Ele é considerado o mais prático e conveniente meio para controlar o processo de hidrólise. O GH também é amplamente usado como indicador para comparar diferentes hidrolisados de proteínas, sendo o principal determinante das propriedades do hidrolisado de proteína (MAHMOUD, 1994; NEVES *et al.*, 2004).

NIELSEN *et al.* (2001) definiu o grau de hidrólise como sendo a porcentagem de ligações de peptídeos clivadas:

$$GH = h / h_{\text{hot}} * 100\%$$

onde h_{hot} é o número total de ligações peptídicas por proteína e h é o número de ligações hidrolisadas. Sendo que h_{hot} é dependente da composição de aminoácidos do material utilizado como substrato.

Existem vários métodos para determinar o grau de hidrólise. Estes métodos variam em complexidade, precisão e exatidão. Eles incluem a técnica do pH-stat, osmometria, solubilidade em ácido tricloroacético (TCA), determinação de nitrogênio-amino por titulação com formol e pelo método que utiliza ácido trinitobenzenosulfúrico (TNBS) (MAHMOUD, 1994; NIELSEN *et al.*, 2001). KRISTINSSON e RASCO (2000^a) salientam que a técnica do pH-stat e da osmometria foram completamente estudadas e demonstraram ser satisfatórias, e que o grau de hidrólise está agora sendo mais geralmente determinado usando o método do TCA ou o método do TNBS.

Após atingir o GH máximo ou desejado, é necessário terminar a reação através de métodos químicos ou térmicos. Geralmente o meio de reação é transferido para um banho com temperatura controlada podendo variar de 75 a 100°C por 5 a 30 minutos para que ocorra a inativação enzimática (HOYLE e MERRIT, 1994).

Segundo PETERSEN (1994) a vantagem de se usar o GH como parâmetro do processo é que %GH parece determinar, sem ambigüidade, as propriedades da proteína de um hidrolisado protéico para um dado sistema proteína-enzima. O grau de hidrólise demonstra, tanto teórica como empiricamente, que quatro variáveis do processo: substrato (S), proporção enzima/substrato (E/S), temperatura (T) e tempo (t), podem ser deixadas sem controle, contanto que o GH seja controlado. Portanto, fica obvio que o GH é um método simples e rápido para a medida da extensão da quebra da proteína (KRISTINSSON e RASCO, 2000^a).

Vários estudos têm sido conduzidos com diferentes tipos de proteínas, no sentido de melhorar ou ampliar seu uso como ingrediente funcional. A aplicação de hidrólise enzimática às proteínas tem sido uma das principais áreas de pesquisa nesse sentido as proteínas tanto podem incrementar quanto diminuir sua funcionalidade, dependendo do grau de hidrólise aplicado, sendo geralmente aceito que uma hidrólise branda é benéfica, ao passo que uma hidrólise extensiva é considerada prejudicial (FURTADO *et al.*, 2001). Um alto grau de hidrólise pode levar a uma alta solubilidade, mas isto pode ter efeitos negativos nas demais propriedades funcionais do hidrolisado. Para manter ou melhorar a funcionalidade, geralmente se faz necessário um baixo grau de hidrólise (MULLALLY *et al.* 1995).

2.6 Fatores que Influenciam o Processo de Hidrólise Enzimática

A velocidade de uma reação enzimática depende da concentração de todos os participantes na presente reação (enzima, substrato, íons hidrogênio, ativadores e inibidores), da força iônica, da constante dielétrica do meio e da temperatura (BELITZ e GROSCH, 1997). De acordo com KRISTINSSON e RASCO (2000^a) a temperatura e o pH do processo são geralmente ajustados para otimizar a cinética da enzima ou mistura de enzimas selecionadas. Uma protease comercial é adicionada em várias concentrações dependendo da taxa de hidrólise necessária. Como o estudo cinético das reações enzimáticas envolvendo todos os parâmetros, citados acima, tornar-se-ia muito extenso, destacaram-se apenas os efeitos do pH, da temperatura e da relação enzima/substrato no processo de hidrólise enzimática.

2.6.1 Efeito do pH na atividade enzimática

Em geral, as enzimas são ativas em uma faixa limitada de pH. Usualmente cada enzima possui um pH ótimo, por se tratarem de proteínas, as enzimas possuem muitos grupos ionizáveis de forma que as variações de pH podem alterar a sua conformação, sua capacidade de união com o substrato e a atividade catalítica dos grupos que formam o centro ativo (WISEMAN, 1985).

A maioria das enzimas apresenta um pH característico em que sua atividade é máxima, acima ou abaixo desse pH, a atividade se reduz. Ainda que os perfis de atividade em função do pH de muitas enzimas tenham a forma de sino, eles podem variar consideravelmente em forma (Figura 2.2). A inter-relação da atividade enzimática com o pH para qualquer enzima depende do comportamento ácido-base da enzima e do substrato, bem como de muitos outros fatores que são, em geral, difíceis de analisar quantitativamente (LEHNINGER *et al.*, 1995).

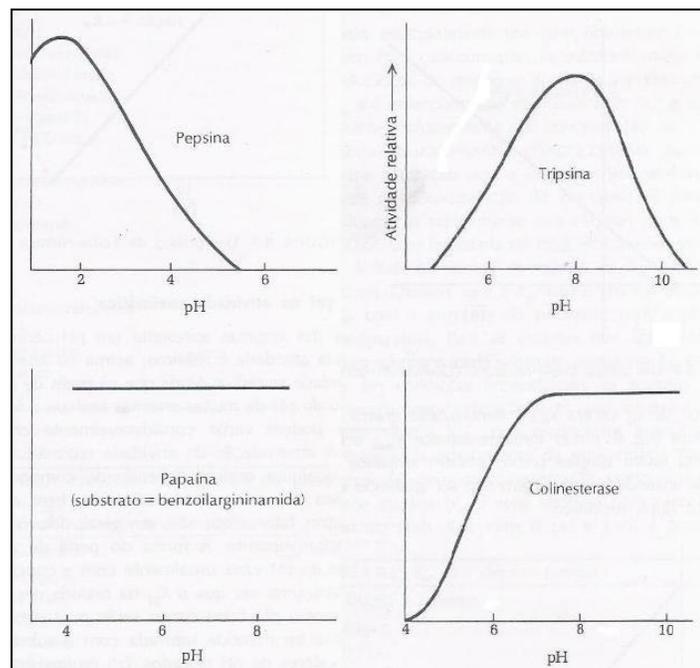


Figura 2.2 - Perfis de atividade em função do pH para alguma enzimas (LEHNINGER *et al.*, 1995).

Este mesmo autor salienta que o pH ótimo de uma enzima não é necessariamente idêntico ao pH de seu meio intracelular normal, que pode estar situado na parte ascendente ou descendente do seu perfil de atividade em função do

pH. Isso sugere que a inter-relação pH e atividade enzimática pode ser um fator intracelular da atividade da enzima.

A inativação química pode se dar tanto pela diminuição ou aumento do pH do meio, até um ponto onde as enzimas forem inativadas. Algumas enzimas são mais sensíveis às mudanças de pH do que às mudanças de temperatura (SHAHIDI *et al.*, 1995). Extremos de pH podem também, assim como temperaturas elevadas, ter efeitos negativos nas proteínas e peptídeos. Muitas proteínas se desdobram a valores de pH menores que 5 e maiores que 10 (KRISTINSSON e RASCO, 2000^a).

2.6.2 Efeito da temperatura nas reações enzimáticas

Nas reações catalisadas por enzimas, da mesma forma que outras reações químicas, a velocidade aumenta ao aumentar a temperatura. A estabilidade da enzima também é influenciada pela temperatura (WISEMAN, 1985). A temperatura é um dos fatores mais estudados na reação enzimática, e verifica-se que a temperatura da reação de hidrólise determina a atividade enzimática, portanto, recomenda-se utilizar temperaturas para máxima atividade das enzimas, ou utilizar um intervalo de temperatura em que a estabilidade das enzimas e dos substratos não seja comprometida (WHITAKER, 1994).

Ainda que as reações catalisadas por enzimas pareçam muitas vezes, apresentar um ótimo de temperatura (Figura 2.3) o pico desse gráfico de atividade catalítica contra a temperatura sugere por que as enzimas, sendo proteínas, são desnaturadas pelo calor, e se tornam inativas à medida que a temperatura é elevada além de um certo ponto. O ótimo aparente de temperatura é, assim, resultante de dois processos: (1) o aumento usual na velocidade de reação com a temperatura e (2) o valor crescente de desnaturação térmica da enzima acima de uma temperatura crítica (LEHNINGER *et al.*, 1995).

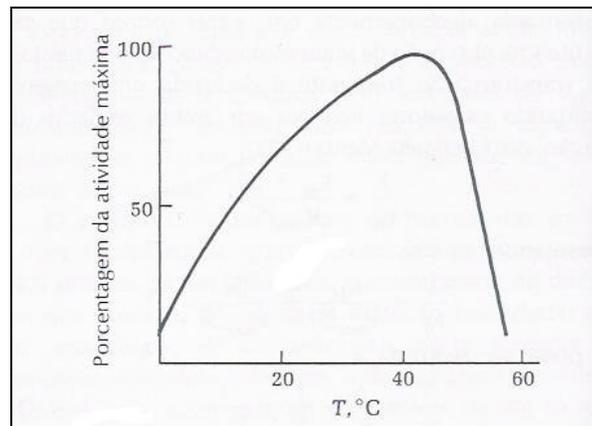


Figura 2.3 - Efeito da temperatura na atividade de uma enzima. (LEHNINGER *et al.*, 1995).

2.6.3 Relação enzima/substrato

A relação enzima/substrato é um fator importante na cinética de reação e influi também na recuperação do produto. Normalmente utiliza-se uma relação que permite uma velocidade de reação de ordem zero. A especificidade da enzima determina principalmente a natureza do produto, podendo resultar frações de diferentes pesos moleculares e consecutivamente diferentes características funcionais. A natureza e o estado de desnaturação das proteínas do substrato são fatores determinantes na taxa de conversão da enzima influenciando na natureza do produto. Assim, podem resultar em peptídeos de diferentes tamanhos ou, até mesmo, aminoácidos livres em função da natureza e do estado do substrato (WHITAKER, 1994).

De acordo com FURLAN e OETTERER (2002), um aumento na relação enzima/substrato resultará em uma diminuição do comprimento médio da cadeia de peptídeos na proteína hidrolisada. Conseqüentemente, resultando em um aumento no valor de grau de hidrólise (GUERARD *et al.*, 2002).

2.7 Propriedades Funcionais das Proteínas e dos Hidrolisados Protéicos

As propriedades funcionais das proteínas referem-se a qualquer propriedade química, físico-química ou física, que afete o processamento ou determine as funções do produto final. As propriedades funcionais refletem a completa interação entre composição, estrutura, conformação e propriedades físico-químicas das proteínas,

bem como a interação destas com outros componentes do alimento, tais como lipídeos, carboidratos, sais, etc (FARFÁN, 1990).

De acordo com SGARBIERI (1998), o termo “funcionalidade” tem sido aplicado para se referir às propriedades não-nutritivas que conferem aos alimentos maior conveniência ao manuseio, melhor aparência na apresentação e melhor aceitação pelo consumidor. Segundo este mesmo autor, a manifestação de funcionalidade, por certos componentes dos alimentos, irá depender das seguintes propriedades:

- Propriedades de hidratação. Dependentes das interações com a água como solubilidade, dispersibilidade, adsorção e retenção de água, suculência.
- Propriedades dependentes da interação entre macromoléculas e entre macromoléculas e a água: geleificação, textura, formação de estruturas viscoelásticas.
- Propriedades de superfície. Dependentes da formação de películas bipolares na interface entre duas fases imiscíveis como as propriedades emulsificantes e espumantes.
- Propriedades que dependem do tamanho e da forma das moléculas ou de partículas em suspensão como viscosidade, sensação tátil, modificada em função da transformação de material sólido em micropartículas.

A maior parte dos ingredientes protéicos disponíveis para fins industriais são misturas de proteínas que contém quantidades apreciáveis de carboidratos, lipídeos, sais minerais, polifenóis e etc. Ainda que preparados protéicos possuam menor quantidade de constituintes não protéicos, estes podem ter sido submetidos a processos de purificação que possam ter afetado tanto a sua estrutura inicial como a sua funcionalidade (FENNEMA,1993).

Certas propriedades funcionais de hidrolisados protéicos exercem um papel predominante no sentido em que irão determinar as características principais do produto final, definindo seu uso. Logo, o tipo e a forma da proteína a ser utilizada como ponto de partida do hidrolisado protéico, assim como o grau de hidrólise aplicado, devem ser controlados em função das principais propriedades funcionais que se deseja explorar (FURTADO *et al.*, 2001).

Segundo PANYAM e KILARA (1996), citados por ROMAN e SGARBIERI (2005), a hidrólise enzimática da proteína resulta em: a) diminuição do peso molecular, b) aumento do número de grupos ionizáveis, c) exposição de grupos hidrofóbicos que estavam protegidos na estrutura original da proteína.

Para ter utilidade e sucesso na aplicação de alimentos, a adição de proteínas para prover aminoácidos essenciais, devem idealmente possuir várias características desejáveis referentes as propriedades funcionais, tais como, solubilidade sob diferentes condições, emulsificação, capacidade de formação de espuma, capacidade de retenção de água, flavor ligante de sabor, texturabilidade e etc (WANG e KISELLA, 1976).

As propriedades funcionais das proteínas hidrolisadas dependem do grau de extensão da hidrólise e também são influenciadas pela especificidade da enzima proteolítica usada, pela natureza física e química da proteína intacta e pelas condições de hidrólise (MAHMOUD, 1994).

2.7.1 Propriedades funcionais hidrofílicas

2.7.1.1 Solubilidade

A solubilidade é provavelmente a propriedade funcional mais importante das proteínas e dos hidrolisados protéicos. Muitas das outras propriedades funcionais, como emulsificação e espuma, são afetadas pela solubilidade e, portanto, é um excelente indicador da funcionalidade do hidrolisado protéico, do seu potencial e limitação de aplicação (MAHMOUD, 1994).

O comportamento das proteínas em relação à solubilidade é muito diverso e depende do número de grupo polares e apolares e de sua localização na molécula. Em geral, as proteínas são solúveis em solventes fortemente polares, como por exemplo, água, glicerol, ácido fórmico e em solventes menos polares, como por exemplo, o etanol. A solubilidade em água depende do pH e da presença de sais (BELITZ e GROSCH, 1997).

BELITZ e GROSCH (1997), ressaltam ainda, que alguns fatores que afetam a solubilidade das proteínas além do pH são: distribuição de cargas, força iônica ou concentração de sais, temperatura e natureza do solvente. O pH afeta a densidade e a distribuição das cargas na molécula da proteína de tal forma que no pH do ponto isoelétrico (pI), a proteína apresentará um mínimo de solubilidade, devido ao número de cargas positivas e negativas ser igual, portanto, elas se neutralizam intramolecularmente. Nestas condições, as moléculas de proteína apresentam menor afinidade pela água, atraindo-se mutuamente a formando uma massa insolúvel que precipita. De acordo com este mesmo autor, a temperatura aumenta a solubilidade das

proteínas até o ponto em que começa a ocorrer à desnaturação térmica. A desnaturação da molécula da proteína coloca grupos hidrofóbicos em contato com o solvente, ocasionando diminuição de solubilidade, podendo haver coagulação e precipitação. Temperaturas acima de 50°C podem provocar desnaturação e diminuição de solubilidade nas proteínas.

As interações hidrofóbicas promovem interações proteína-proteína e resultam na diminuição da solubilidade, enquanto que interações iônicas promovem interações proteína-água e resultam num aumento da solubilidade. Resíduos iônicos na superfície dos peptídeos e proteínas introduzem repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína e repulsão entre as moléculas hidratadas ao redor dos grupos iônicos, ambos grandes contribuintes para o aumento da solubilidade das proteínas (MORR, 1995).

A melhor solubilidade de um hidrolisado é devido ao tamanho menor de suas moléculas, comparada com a proteína intacta, e aos grupos amino e carboxila ionizáveis dos aminoácidos recém expostos, que aumentam a hidrofiliabilidade do hidrolisado. Embora o aumento da solubilidade tenha uma relação positiva com a extensão da hidrólise, precisa-se cuidar para que o hidrolisado não seja extensivamente hidrolisado (MULLALLY *et al.* 1995).

2.7.1.2 Capacidade de retenção de água (CRA)

A água presente nos tecidos dos animais é encontrada na forma ligada, imobilizada e livre. A capacidade de retenção de água (CRA) é uma propriedade de importância fundamental em termos de qualidade, tanto na carne destinada ao consumo direto, como para a carne destinada à industrialização. A capacidade de retenção de água é definida como a capacidade da carne em reter sua umidade ou água durante a aplicação de forças externas, como corte, aquecimento, trituração e prensagem. Durante uma aplicação suave de qualquer um desses tratamentos, há uma certa perda de umidade, devido a uma parte da água presente na carne e encontrar-se na forma livre (SOUZA, 2005).

A capacidade de retenção de água da carne é de grande importância nos processos tecnológicos, e depende do pH e do meio iônico. A carga total de uma proteína e, em consequência suas alterações eletrostáticas, alcançam sua maior intensidade no ponto isoelétrico. A capacidade de retenção de água da carne é mínima em um intervalo de pH de 5-5,5. A adição de sais provoca como consequência

a formação preferentemente de enlaces aniônicos, um deslocamento do ponto isoelétrico e um mínimo de embibição ocorre em valores inferiores de pH. Isso significa uma maior capacidade de retenção e água em presença de sais a qualquer pH superior ao ponto isoelétrico da carne sem salgar (BELITZ e GROSCH, 1997).

A capacidade de retenção de água envolve uma interação entre a proteína ou alimentos protéicos com a água. A maior ou menor afinidade da proteína com a água está relacionada com outras propriedades funcionais como a textura, viscosidade, geleificação e emulsificação (SGARBIERI, 1998).

Segundo KRISTINSSON e RASCO (2000^a) as propriedades funcionais das proteínas em um sistema alimentício, de certa forma dependem da interação proteína-água dependendo do resultado final de como e quanto às proteínas ligam e mantém água no sistema. Este mesmo autor relata, por exemplo, que hidrolisados protéicos de pescado possuem excelente capacidade de retenção de água, sendo adequados para certas formulações de alimentos.

2.7.2 Propriedades de superfície

2.7.2.1 Capacidade emulsificante (CE)

As emulsões são sistemas dispersos de dois ou mais líquidos imiscíveis entre si. Sua estabilização ocorre com emulsionantes, compostos que formam interfaces limitantes evitando assim a coalescência da fase dispersa. Para que uma proteína seja adequada como emulsionante depende da velocidade com que ela se difunde na interface, de sua adsorbabilidade e da deformabilidade da sua conformação devido à influência da tensão superficial (desnaturação da superfície). A velocidade de difusão depende da temperatura e do peso molecular, que por sua vez influenciam o pH e a força iônica. A adsorbabilidade depende da extensão dos grupos hidrofóbicos e hidrofílicos e por tanto do perfil de aminoácidos, assim como do pH, da força iônica e da temperatura (BELITZ e GROSCH, 1997).

A propriedade de emulsificação da proteína hidrolisada será melhorada através do cuidadoso controle da extensão da hidrólise, pois uma hidrólise extensa pode resultar em drástica perda da mesma. Embora os peptídeos menores sejam mais estáveis e se difundam mais rapidamente na interface, eles são menos eficientes em reduzir a tensão interfacial, pois eles não conseguem se desdobrar ou reorientar-se na interface, como as proteínas de alto peso molecular (TURGEON et al., 1991).

QUAGLIA e ORBAN (1990) estudaram os efeitos das propriedades de emulsificação em hidrolisados protéicos de pescado, e observaram que havia uma relação com a porcentagem do grau de hidrólise, onde constataram que a hidrólise enzimática possui uma influência negativa na capacidade de formar uma emulsão estável, a medida que o grau de hidrólise aumenta. Hidrolisados com diferentes distribuições de pesos moleculares demonstraram que um conteúdo maior de frações protéicas de alto peso molecular desempenha um papel importante no que diz respeito à estabilização da emulsão. Hidrolisados com baixo grau de hidrólise possuem uma hidrofobicidade de superfície maior demonstrando serem melhores emulsificantes comerciais.

A capacidade de emulsificação de um hidrolisado é normalmente definida como o volume de óleo (mL) que possa a ser emulsionado pelo hidrolisado protéico (g), antes que ocorra inversão da fase ou colapso da emulsão (KRISTINSSON e RASCO, 2000^a).

As propriedades emulsionantes ideais para uma emulsão óleo/água seriam de uma proteína com peso molecular relativamente baixo, com uma composição equilibrada de aminoácidos terminais carregados, uma boa solubilidade em água, uma hidrofobicidade de superfície ampla e uma conformação relativamente estável (BELITZ e GROSCH, 1997).

2.7.2.2 Capacidade de retenção de óleo (CRO)

Para a determinação da capacidade de retenção de óleo os hidrolisados são misturados a uma quantidade específica de óleo por um determinado tempo e então centrifugados a uma baixa velocidade e a CRO é expressa em mg de óleo que são absorvidos por g de hidrolisado (SHAHIDI *et al.*, 1995). O mecanismo de retenção de absorção de óleo, como calculado por este método, é atribuído predominantemente pela ligação física do óleo, e conseqüentemente quanto maior a densidade da proteína, maior a absorção de óleo, estando relacionado com a hidrofobicidade da superfície protéica (KRISTINSSON e RASCO, 2000^a).

2.7.2.3 Capacidade de formação e estabilização de espuma

As proteínas atuam em distintos alimentos como formadoras e estabilizadoras de espuma, por exemplo em produtos de panificação, doces e cervejas. As espumas

são dispersões de gases em líquido. As proteínas se estabilizam formando películas flexíveis, coesivas ao redor das bolhas de gás. Durante a agitação, as proteínas se adsorvem em uma interface devido aos seus domínios hidrofóbicos, no que vão se unindo em um aglomerado parcial. A redução da tensão superficial condicionada pela adsorção de proteínas facilita a formação de novas interfaces e de mais bolhas de gás. As proteínas aglomeradas se associam formando uma película estável (BELITZ e GROSCH, 1997).

A qualidade espumante de uma proteína deve ser estudada quanto ao volume de espuma formado sob certas condições, a estabilidade e a densidade da espuma (SGARBIERI, 1998). A capacidade de uma proteína para formar espuma é maior quanto mais rápido é difundida para as interfaces e quanto mais facilmente se desnatura. Por sua vez, isto depende do peso molecular, da hidrofobicidade das superfícies e da estabilidade da conformação (BELITZ e GROSCH, 1997).

A capacidade de formação de espuma é medida pelo aumento do volume de uma dispersão de proteína como resultado da incorporação de ar por batimento, agitação ou aeração. Proteínas ideais para formação de espuma têm a propriedade de formar membranas extensíveis em torno das bolhas de ar passando por certo grau de desnaturação que parece ser crítico para a estabilização das espumas e de sua estrutura tridimensional (SGARBIERI, 1998).

2.8 Digestibilidade *in vitro*

Segundo SGARBIERI (1996) a digestibilidade da proteína deve ser entendida como sendo a parte ou porção da proteína que pode ser hidrolisada pelas enzimas digestivas até aminoácidos e que, portanto, estaria disponível biologicamente, desde que não houvesse nenhuma interferência na absorção dos aminoácidos pelo organismo humano. *In vitro*, a digestibilidade de uma proteína é estimada usando-se enzimas proteolíticas que agem normalmente na digestão procurando-se imitar, inclusive, as condições de acidez ou de pH, características do estômago e do intestino onde a digestão das proteínas se processa. De acordo com ABDUL-HAMID *et al.* (2002), geralmente, um sistema multi-enzimático é usado para determinação da digestibilidade da proteína, com o objetivo de reduzir efeitos causados por um específico inibidor enzimático, o que gera uma melhor aproximação da digestibilidade da proteína.

A digestibilidade da proteína é um fator importante na determinação do valor nutritivo de uma proteína. É avaliada pelo quociente do nitrogênio absorvido pelo nitrogênio ingerido com a dieta, expresso em porcentagem (SGARBIERI, 1996).

2.9 Secagem de Alimentos

A secagem pode ser definida como um processo de remoção de líquido de um sólido, através da evaporação. Quando o calor necessário para evaporar a água é fornecido ao material, ocorrem transferências simultâneas de calor (para evaporar o líquido) e de massa, na forma de líquido ou de vapor dentro do sólido e na forma de vapor a partir da superfície (FOUST *et al*, 1980).

A secagem tem por finalidade a redução da umidade de um produto a um nível desejado. A secagem de materiais sólidos e alimentícios, particulados ou não pode ser efetuada industrialmente em uma grande variedade de equipamentos e dentre eles podemos destacar os secadores rotativos, de leito deslizante, de leito de jorro e secadores de bandeja. A escolha da técnica de secagem para uma determinada tarefa depende de fatores que estão associados às características do próprio material e às propriedades de produção requeridas para o produto final (PERRY e GREEN, 1984).

Na secagem de alimentos os secadores mais selecionados são com ventilação de ar forçado. O processo é conhecido como secagem por convecção, recomendada na secagem de alimentos com alto conteúdo de umidade considerada uma técnica convencional de conservação de alimentos, usada em muitos países. O processo especialmente conveniente por sua simplicidade, o que permite determinar as condições ótimas para o desempenho de secagem, nos mais diversos alimentos (TELLO-PANDURO *et al*, 2004, KONISHI e KOBAYASHI, 2003, VEGA-MERCADO *et al*, 2001).

Durante a secagem, a água interna migra para a superfície externa por meio de muitos mecanismos como difusão, capilaridade, sucessões de evaporação-condensação e outros. Estes mecanismos dependem da estrutura interna do material, do comportamento do produto durante a secagem e do tipo de ligação que une a água com o sólido (LIM *et al*, 2004).

2.9.1 Curvas de secagem

Na secagem de um sólido úmido, mediante um gás a uma temperatura e a uma umidade fixas, manifesta-se um certo tipo de comportamento. De acordo com

GEANKOPLIS (1993), os dados obtidos durante o processo de secagem permitem graficar o conteúdo de umidade do material em função do tempo. O gráfico de teor de umidade (X) contra o tempo (Fig. 2.4) é a forma que geralmente deve-se obter com os dados de ensaios de secagem. A Figura 2.5, que é o gráfico de velocidade de secagem em função do teor de umidade, é muito mais descritivo do processo de secagem. É o gráfico que se obtém derivando os dados da Figura. 2.4; tem considerável flutuação de resultados e, por isso, razoável incerteza (FOUST *et al*, 1980).

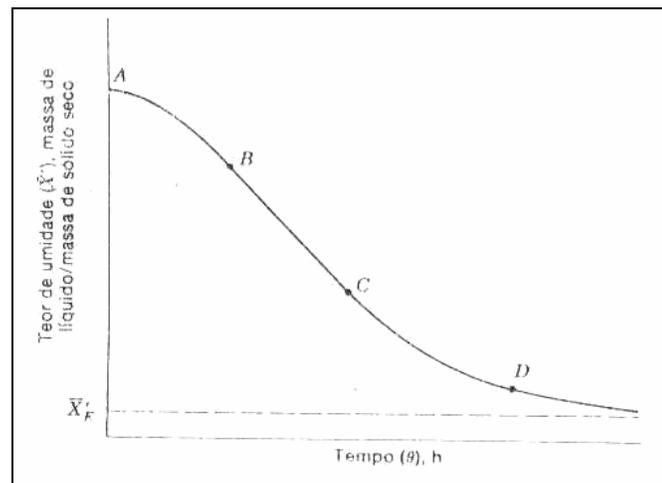


Figura 2.4 - Curva de secagem típica em condições constantes de secagem, teor de umidade livre em função do tempo (FOUST *et al*, 1980).

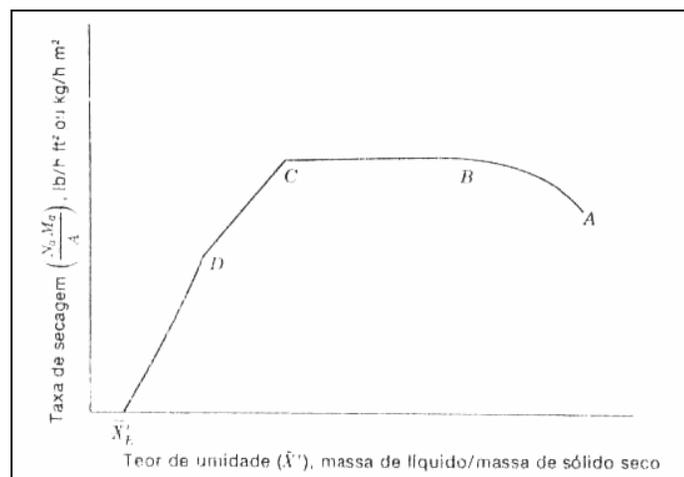


Figura 2.5 - Curva de taxa de secagem típica em condições constantes de secagem, taxa (velocidade) de secagem em função do teor de umidade (FOUST *et al*, 1980).

O processo de secagem de um produto, sob condições constantes de temperatura, umidade relativa e velocidade do ar, pode ser dividido em um período de taxa constante e um período de taxa decrescente (VILLELA & SILVA, 1992). Estas curvas típicas de secagem estão relacionadas aos mecanismos de realização da secagem. O período de secagem representado pelo segmento AB das curvas da Fig. 2.4 e da Fig. 2.5 é o período em regime não permanente, durante o qual a temperatura do sólido atinge o seu valor de regime permanente. Embora a forma que está na figura seja típica, é possível obter qualquer outra forma, e AB pode ocorrer com uma velocidade crescente, conforme se mostra, ou com uma velocidade decrescente.

Durante o período de taxa constante (segmento BC das curvas de secagem das Figuras 2.4 e 2.5), toda a superfície exposta do sólido está saturada de água. A secagem ocorre como se fosse a evaporação de uma massa de líquido, sem haver influência direta do sólido na taxa de secagem (FOUST *et al.*, 1980; GEANKOPLIS, 1993). Esse período ocorre até o momento em que o conteúdo de umidade do sólido atinge o valor X_c (umidade crítica) em que o fluxo de água que migra do interior do sólido é menor que a água superficial evaporada surgindo então regiões secas sobre a superfície, dando origem ao início da taxa decrescente (TREYBAL, 1981).

O período de secagem, entre os pontos C e D da Fig. 2.5, denominado “o primeiro período de taxa decrescente”, a superfície fica paulatinamente mais pobre em líquido, pois a velocidade do movimento para a superfície é menor que a velocidade com que a massa é transferida da superfície. No ponto D não há, na superfície, qualquer área significativamente saturada no líquido. Nos teores de umidade mais baixos que os do ponto D da Figura 2.5 toda evaporação ocorre a partir do interior do sólido. À medida que o teor de umidade continua a cair, a distância a ser coberta na difusão do calor e da massa aumenta até que, em X_E' , o teor de umidade de equilíbrio cessa a secagem. O teor de umidade de equilíbrio é atingido quando a pressão de vapor sobre o sólido é igual à pressão parcial de vapor no gás secante afluyente. Este período é denominado o “segundo período de taxa decrescente” (FOUST *et al.*, 1980; GEANKOPLIS, 1993; PERRY e GREEN, 1984).

2.9.2 Teoria da difusão líquida

Nesta teoria a difusão de umidade líquida ocorre quando há uma diferença de concentração entre o interior do sólido e a superfície. Este método de transporte de umidade é usualmente encontrado em sólidos não-porosos onde soluções de uma

única fase são formadas com a umidade, como em massa, sabão, gelatina e cola. Na secagem de muitos produtos alimentícios, o movimento da água no período de taxa decrescente ocorre por difusão (GEANKOPLIS, 1993).

Uma importante correlação na secagem de alimentos é a lei exponencial descrita por BALA e WOODS (1991), que apresenta uma solução analítica para os modelos da cinética de secagem que estuda a difusividade na secagem de alimentos. A lei exponencial estabelece que a taxa de secagem é proporcional ao conteúdo de umidade conforme a Equação 2.1:

$$\frac{dX}{dt} = -K(X - X_e) \quad \text{Equação (2.1)}$$

Onde: X é o conteúdo de umidade; X_e é o conteúdo de umidade de equilíbrio e K é a constante de secagem.

Quando a difusão líquida da umidade controla a taxa de secagem no período de taxa decrescente, a segunda lei de Fick para difusão em regime transiente pode ser escrita conforme a Equação 2.2 descrita por GEANKOPLIS (1993):

$$\frac{\partial X}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 X}{\partial x^2} \quad \text{Equação (2.2)}$$

Onde: D_L = coeficiente de difusão do líquido; x = distância no sólido e t = tempo.

Uma maior dificuldade em analisar dados de secagem por difusão é que a distribuição de umidade inicial não é uniforme através do sólido no início se um período de secagem à taxa constante precede o período à taxa decrescente. Durante a secagem por difusão, a resistência à transferência de massa de vapor d'água da superfície é usualmente muito pequena, e a difusão no sólido controla a taxa de secagem. Então o conteúdo de umidade na superfície está no valor de equilíbrio (X_e). Isto significa que o conteúdo de umidade livre (X), na superfície é essencialmente zero. Integrando a Equação 2.3:

$$\frac{X - X_e}{X_0 - X_e} = \frac{(8)}{\pi^2} \left(e^{-[D_L (\pi / 2x_1)^2 t]} \right) \quad \text{Equação (2.3)}$$

sendo K = D_L.(π/2x₁)² e substituindo na equação anterior

$$\frac{X - X_e}{X_0 - X_e} = \frac{8}{\pi^2} (e^{-Kt}) \quad \text{Equação (2.4)}$$

onde: X = conteúdo de umidade livre no sólido para t ; X_e = umidade de equilíbrio, onde $X_e \neq 0$ em $t=0$; X_0 = umidade total do sólido em $t = 0$ e t = tempo de secagem do sólido.

2.10 Aplicações dos Hidrolisados Protéicos

As proteínas representam uma importante classe de ingredientes funcionais por que elas possuem uma gama de dinâmicas propriedades funcionais, apresentam versatilidade durante o processamento e podem formar redes e estruturas. Elas também proporcionam aminoácidos essenciais, cumprindo ambos os requerimentos funcionais e nutricionais (LICEAGA-GESUALDO e LI-CHAN, 1999).

Os hidrolisados protéicos possuem várias propriedades funcionais que os tornam atraentes, tanto como fonte de proteína para nutrição humana como em produtos para uso médico especial e em produtos para consumo de uso mais geral. As propriedades dos hidrolisados, combinadas com a recente evolução tecnológica de proteína hidrolisada tornou possível à obtenção de um hidrolisado protéico de alto paladar. Os hidrolisados protéicos possuem um alto potencial de aplicação em sucos e outras bebidas enriquecidas com proteína (FROKJAER, 1994) e são geralmente utilizados para modificar propriedades funcionais de alimentos e em alimentos dietéticos, como fonte de pequenos peptídeos e aminoácidos (FURLAN e OETTERER, 2002).

A aplicação de hidrolisados protéicos varia em função da distribuição do peso molecular dos peptídeos. Assim, peptídeos com pesos moleculares entre 5 e 20kDa são utilizados geralmente como fontes de nitrogênio, em alimentos para fins especiais e suplementos alimentares para adultos. Já peptídeos com pesos moleculares menores que 5kDa são oriundos de proteínas altamente hidrolisada sendo frequentemente utilizados em formulações hipoalergênicas (NEVES *et al.*, 2004).

LEE *et. al* (2001) ressaltaram que a proteína hidrolisada é comumente utilizada na produção de alimentos, tais como realçador de sabor proteína vegetal hidrolisada, para dietas hospitalares de pacientes e proteína para controle de peso em dietas. HALE (1972) destacou que a proteína hidrolisada de pescado encontra maior aplicação em misturas para sopas secas, caldos ou molhos. Com modificação no flavor estes hidrolisados poderiam satisfazer a necessidade de proteína solúvel

concentrada para fortificação de bebidas. Também encontrariam aplicação em saborosas bolachas, sanduíches e macarrões.

Recentemente o interesse no uso de proteína hidrolisada de pescado para o consumo humano tem aumentado. YU e TAN (1990) citados por ABDUL-HAMID *et al.* (2001), concluíram que bolacha de pescado, contendo proteína hidrolisada de tilapia negra (*Oreochromis mossambicus*), era aceitável em termos de aparência, textura e cor. LICEAGA-GESUALDO e LI-CHAN (1999) enfatizaram que a proteína hidrolisada de pescado poderia também ser considerada como uma fonte alternativa de ingredientes protéicos utilizada na indústria de alimentos.

FONKWE e SINGH (1996) relataram em seu estudo que o hidrolisado obtido de resíduos de carne de peru mecanicamente separada, por apresentar uma excelente solubilidade em água em uma larga faixa de pH, encontraria aplicação em uma série de produtos, tais como, alimentos para dieta, bebidas com alto conteúdo de proteínas, comida hipoalergênica para bebês, etc., mercado que na atualidade é dominado por hidrolisados de caseína e de soja. De acordo com LAHL e BRAUN (1994) a caseína, a proteína do soro e a proteína de soja são geralmente mais usadas em produtos nutricionais contendo proteína hidrolisada.

Segundo GUERARD *et al.* (2002), os peptídeos obtidos da hidrólise enzimática de resíduos de atum poderiam ser usados em uma variedade de aplicações incluindo a pesquisa de peptídeos biologicamente ativos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Matéria-prima

As matérias-primas utilizadas para a obtenção dos hidrolisados protéicos foram coxa de frango e peito de frango sem pele e sem osso, obtidos do comércio local da cidade do Rio Grande (RS). A coxa de frango foi desossada manualmente e retirada sua pele. A carne dos diferentes cortes foi triturada em um processador homogeneizador (Walita Mega Máster Plus) e acondicionada em sacos plásticos, e estocada em freezer comum a -18°C.

3.1.2 Enzimas

As enzimas utilizadas para a obtenção dos hidrolisados protéicos foram a Alcalase 2.4L e a Flavourzyme 1000L MG obtidas da empresa Novozymes Latino Americana. A Alcalase 2.4L é uma endoprotease de *Bacillus licheniformis*, sendo a subtilisina Carlsberg seu maior componente enzimático, possuindo uma atividade específica declarada de 2.4 Unidades Anson (UA) por grama. Uma UA é a quantidade de enzima que sob condições padrão digere a hemoglobina em uma taxa inicial que produz uma quantidade de produto solúvel em ácido tricloroacético que gera a mesma cor com reagente de Folin correspondente a um miliequivalente de tirosina liberado por minuto. A Flavourzyme 1000L MG é uma exopetidase e endoprotease complexa com atividade de 1LAPU/g. Um LAPU (Unidade de leucina aminopeptidase) é a quantidade de enzima que hidrolisa 1µmol de leucina-p-nitroanilida por minuto.

3.1.3 Reagentes químicos

Os reagentes químicos utilizados no processamento assim como nas análises químicas possuíram qualidade P. A.

3.1.4 Infra-estrutura

O processo tecnológico foi desenvolvido nos laboratórios de Tecnologia de Alimentos, Bioquímica Tecnológica e Operações Unitárias, localizados no Campus Cidade da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

3.2. Métodos

3.2.1 Determinações físico-químicas

3.2.1.1 Composição proximal

A carne de frango e os hidrolisados protéicos obtidos tiveram sua composição proximal determinada de acordo com a metodologia recomendada pela AOAC (1995):

- Proteína: utilizando o método de Kjeldahl ($N \times 6,25$);
- Lipídios: método gravimétrico de extração a quente de lipídios utilizando extrator de Soxhlet;
- Cinzas: método gravimétrico em mufla (550-600 °C);
- Umidade: método gravimétrico em estufa (105 °C).

Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

3.2.1.2 Determinações físicas

A determinação do pH da matéria-prima, das soluções tampão e dos hidrolisados foram realizados utilizando-se um potenciômetro de bancada digital (Analion-PM608), sendo que para a determinação do pH da matéria-prima, homogeneizou-se uma amostra de carne com água destilada na proporção de 1:1.

3.2.2 Processo de obtenção do hidrolisado protéico de carne de frango

Através da Figura 3.1 pode-se observar o fluxograma do processo para obtenção e caracterização dos hidrolisados protéicos de carne de frango utilizando enzimas proteolíticas.

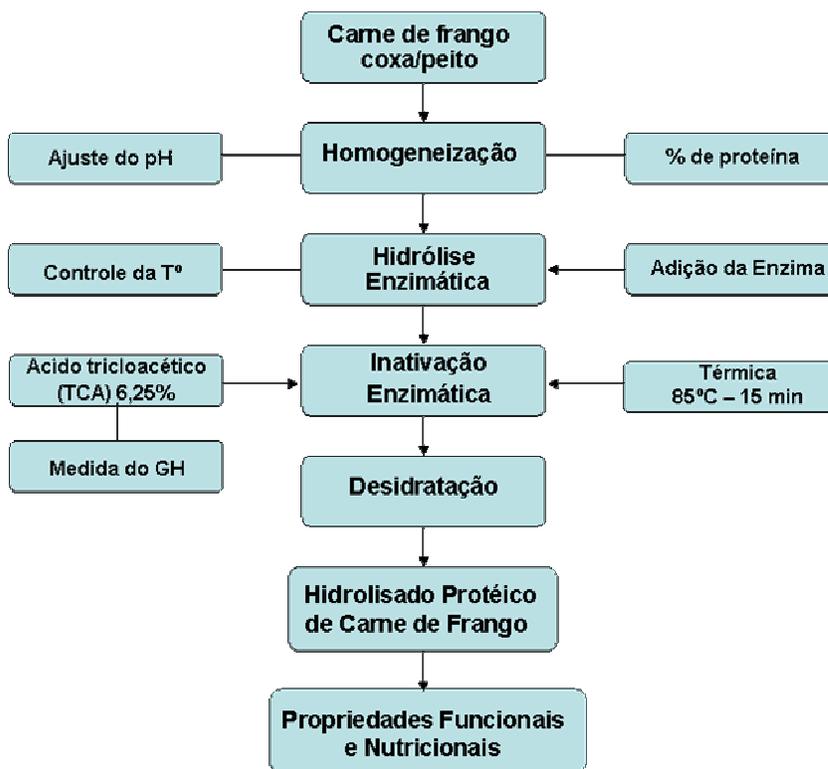


Figura 3.1: Fluxograma experimental da obtenção e caracterização do H.P.C.F (hidrolisado protéico de carne de frango).

3.2.2.1 Carne de frango

A carne de frango foi descongelada a temperatura ambiente (20-25°C) e pesada conforme a quantidade necessária para cada ensaio.

3.2.2.2 Homogeneização

A carne de frango foi homogeneizada em liquidificador doméstico (Walita Twist) com solução tampão de McIlvaine 0.1M (fosfato-citrato) durante 1 minuto para ajustar e fixar o pH na faixa ótima de atividade enzimática.

3.2.2.3 Hidrólise enzimática

A reação enzimática foi a hidrólise das proteínas da carne de frango. As enzimas foram adicionadas ao meio variando a sua quantidade em relação à massa total de proteínas de 4 a 8% (p/p)[enzima/proteína], em diferentes concentrações de

substrato que variaram de 5 a 10% (p/v) [proteína (por Kjeldahl)/volume total de suspensão]. O volume do homogeneizado foi de 100 mL para o estudo do grau de hidrólise e 1000 mL para a obtenção dos hidrolisados. As reações enzimáticas ocorreram nas condições ótimas de pH e temperatura para máxima atividade de cada enzima de acordo com a literatura (DAUKSAS *et al.*, 2005; CLAVER e ZHOU, 2004; GBOGOURI *et al.*, 2004; SLYZYTE *et al.*, 2004; CÂNDIDO e SGARBIERI, 2003; FURLAN e OETTERER, 2002; KILCAWLEY *et al.*, 2002; ABDUL e HAMID, 2001; SMYTH e FITZGERALD, 1998). As reações enzimáticas foram executadas em um reator de vidro de parede dupla conectado a um banho termostatizado (Quimis[®], modelo 214), mantendo a temperatura fixa em 50 e 55°C para as reações com as enzimas Flavourzyme e Alcalase, respectivamente. O pH foi fixado no valor de 7 para enzima Flavourzyme e de 7,5 para a enzima Alcalase. A agitação foi mantida constante em 200 rpm para reações enzimáticas de 100 mL e 600 rpm para reações enzimáticas de 1000 mL, utilizando um agitador eixo-hélice (Quimis[®], modelo Q-215). O tempo de reação variou de 60 a 120 minutos.

3.2.2.4 Inativação enzimática

A inativação enzimática ocorreu de duas maneiras, com ácido tricloroacético (TCA) para posterior medida do grau de hidrólise e termicamente para a obtenção do produto final. A inativação térmica ocorreu a 85°C durante 15 minutos de acordo com a literatura (HOYLE e MERRITT, 1994; HRCKOVÀ *et al.*, 2002; LICEAGA-GESUALDO e LI-CHAN, 1999). Através da Figura 3.2 podemos observar o sistema utilizados de hidrólise enzimática, incluindo dois banhos termostatizados, um para manter a temperatura de reação e outro para inativação térmica.

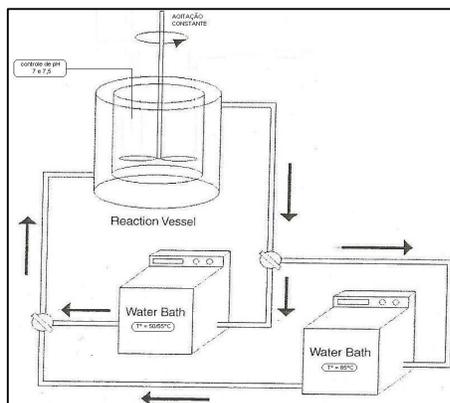


Figura 3.2 – Sistema utilizado para hidrólise enzimática.

3.2.2.5 Desidratação

A desidratação foi realizada com a secagem dos hidrolisados em secador de bandejas a 60°C até umidade comercial aproximada de 10%, segundo a legislação para produtos do tipo “Pós para preparo de alimentos”.

3.2.2.6 Hidrolisado protéico de carne de frango (HPCF)

O produto final obtido (HPCF) após secagem foi acondicionado em recipientes herméticos e armazenado em temperatura de refrigeração.

3.2.2.7 Propriedades funcionais e nutricionais

Os HPCF foram avaliados segundo as suas propriedades funcionais de solubilidade, capacidade emulsificante, capacidade de formação de espuma, capacidade de retenção de água e óleo, e o valor nutricional de acordo com sua digestibilidade.

3.2.3 Grau de hidrólise

O grau de hidrólise (GH) foi determinado segundo o método descrito por PEZOA e MELLADO (1979). Transcorrido o tempo de hidrólise, alíquotas de 1 mL dos hidrolisados foram tomadas, inativando a seguir a reação com 9mL de uma solução de TCA 6,25% e após filtração, o teor de proteínas solúveis no filtrado foi determinado utilizando o método de Folin-Lowry descrito por PLUMMER (1978) e expresso em mg de albumina (de acordo com a curva padrão: $Y = 2,47 \cdot X$; X em mg albumina/mL). O grau de hidrólise (%GH) foi determinado como a porcentagem de proteínas solúveis em relação à quantidade de proteína inicial total, o qual foi calculado segundo a Equação 3.1:

$$\%GH = \frac{\text{Proteína solúvel em TCA 6,25\%}}{\text{Proteína total na amostra}} \times 100 \quad (\text{Equação 3.1})$$

3.2.4 Planejamento experimental

Com a finalidade de avaliar a influência da variação da concentração de substrato, da concentração de enzima e do tempo no processo de hidrólise das

proteínas da carne de frango, realizou-se um planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central e seis pontos axiais, considerando como variável dependente o grau de hidrólise das proteínas. A Tabela 3.1 apresenta a matriz do planejamento com os níveis codificados e reais para cada variável independente estudada.

Tabela 3.1 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 para hidrólise enzimática das proteínas da carne de frango ($\alpha = 1,68$).

ensaios	[S] (%p/v)	[E] (%p/p)	t (min)
1	-1 (5)	-1 (4)	-1 (60)
2	1 (10)	-1 (4)	-1 (60)
3	-1 (5)	1 (8)	-1 (60)
4	1 (10)	1 (8)	-1 (60)
5	-1 (5)	-1 (4)	1 (120)
6	1 (10)	-1 (4)	1 (120)
7	-1 (5)	1 (8)	1 (120)
8	1 (10)	1 (8)	1 (120)
9	-1,68 (3,3)	0 (6)	0 (90)
10	1,68 (11,7)	0 (6)	0 (90)
11	0 (7,5)	-1,68 (2,9)	0 (90)
12	0 (7,5)	1,68 (9,1)	0 (90)
13	0 (7,5)	0 (6)	-1,68 (39,6)
14	0 (7,5)	0 (6)	1,68 (140,4)
15	0 (7,5)	0 (6)	0 (90)
16	0 (7,5)	0 (6)	0 (90)
17	0 (7,5)	0 (6)	0 (90)

O planejamento experimental apresentado na Tabela 3.1 foi realizado para as hidrólises das enzimas Alcalase e Flavourzyme sobre peito e coxa de frango separadamente, ou seja, quatro vezes, totalizando 68 ensaios. A influência da concentração de substrato, da concentração de enzima e do tempo sobre o grau de hidrólise foi avaliada estatisticamente submetendo os resultados obtidos a análise de efeitos e verificação dos modelos empíricos através dos coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA) utilizando o programa Statistica versão 6.0 for Windows.

Os níveis estudados para as variáveis independentes do planejamento experimental utilizado para a obtenção dos hidrolisados enzimáticos de carne de frango foram baseadas em condições trabalhadas por diferentes pesquisadores (CENTENARO, 2007; SANTOS, 2006; NILSANG *et al.*, 2005; ROMAN e SGARBIERI, 2005; DINIZ e MARTIN, 1997).

3.2.5 Secagem dos hidrolisados

Os hidrolisados protéicos de carne de frango de maior e menor grau de hidrólise obtidos de acordo com o planejamento fatorial, com ambas as enzimas e substratos, num total de 8 hidrolisados, foram selecionados para a avaliação de suas propriedades funcionais e nutricionais. Inicialmente foram levantadas curvas de secagem para estudar o comportamento de secagem dos diferentes hidrolisados. Estes hidrolisados foram submetidos a um processo de secagem em um secador de bandejas com escoamento de ar paralelo a uma temperatura de 60°C. No processo de secagem utilizaram-se placas de petri com uma área superficial de 0,017 m² e com uma camada de amostra correspondente a 5 mm de espessura.

3.2.5.1 Metodologia aplicada no tratamento dos resultados experimentais

I) Primeiramente, determinou-se os valores de umidade de cada amostra. Para tal, aplicou-se a Equação 3.2 aos dados obtidos para as amostras secas em estufa 105°C:

$$U = [(M_{\text{amostra úmida}} - M_{\text{amostra seca}}) / (M_{\text{amostra úmida}})] \times 100 \quad (\text{Equação 3.2})$$

Onde: U = umidade da amostra (%); M= massa (g).

II) Após, estimou-se a massa de água presente na amostra em análise pela Equação 3.3:

$$M_{\text{H}_2\text{O}} = M_{\text{total da amostra}} \cdot U \quad (\text{Equação 3.3})$$

Onde: U = fração de umidade determinada para a amostra; M = massa (g).

III) Conhecendo as massas de amostra e de água, por diferença, estimou-se a massa de sólido seco (M_{ss}), para a amostra analisada conforme Equação 3.4:

$$M_{\text{ss}} = M_{\text{total de amostra}} - M_{\text{H}_2\text{O}} \quad (\text{Equação 3.4})$$

IV) A massa de sólido foi subtraída de cada valor de amostra (g), obtido por pesagem durante o processo de secagem. Assim, se obteve as massas de água contidas na amostra em cada ponto tomado de acordo com a Equação 3.5:

$$M_{\text{água}} = M_{\text{amostra}} - M_{\text{s.s.}} \quad (\text{Equação 3.5})$$

Onde: $M_{\text{água}}$ = massa de água presente na amostra no tempo t (g); $M_{\text{total de amostra}}$ = massa de amostra no tempo t (g); $M_{\text{s.s.}}$ = massa de sólido seco, valor constante ao longo de todo processo de secagem (g).

V) Com as massas de água contidas na massa de amostra em cada ponto e conhecendo a massa de sólido seco, estimou-se as respectivas umidades livres segundo a Equação 3.6:

$$X = M_{\text{água}} / M_{\text{s.s.}} \quad (\text{Equação 3.6})$$

Onde: X = umidade livre remanescente na amostra ($\text{g}_{\text{H}_2\text{O}} / \text{g}_{\text{s.s.}}$).

VII) Consequentemente calculou-se o adimensional de umidade (X/X_0), cujos valores numéricos foram obtidos dividindo-se cada valor de “ X ” pelo valor de umidade inicial “ X_0 ”.

VIII) Também foram calculados os valores médios de umidade livre utilizando uma média aritmética conforme Equação 3.7:

$$X_{\text{médio}} = (X_1 + X_2)/2 \quad (\text{Equação 3.7})$$

IX) Para obter-se maiores informações da velocidade da perda de água em função do tempo, converteu-se os dados do conteúdo de umidade em função do tempo em taxa de secagem (N), sendo esta determinada de acordo com a Equação 3.8.

$$N = \Delta X / \Delta t \quad (\text{Equação 3.8})$$

Onde: N = taxa de secagem ($\text{g}_{\text{H}_2\text{O}} / \text{g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{min}$); $\Delta X = X_2 - X_1$ = umidade removida do sólido ($\text{g}_{\text{H}_2\text{O}} / \text{g}_{\text{s.s.}}$); $\Delta t = t_2 - t_1$ = intervalo de tempo (min).

X) A quantidade de água evaporada (N_A) pode então ser estimada em função da taxa e da área de secagem segundo a Equação 3.9:

$$N_A = (N \cdot M_{\text{ss}}) / A \quad (\text{Equação 3.9})$$

Onde: N = taxa de secagem ($\text{g}_{\text{H}_2\text{O}} / \text{g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{min}$); N_A = taxa de secagem por unidade de área ($\text{g}_{\text{H}_2\text{O}} / \text{min} \cdot \text{cm}^2$); M_{ss} = massa de sólido seco (g); A = área de secagem ($0,017 \text{ cm}^2$).

XI) O valor da constante de secagem K foi calculado a partir do coeficiente angular determinado pela regressão não linear dos dados de adimensional de secagem em função do tempo, usando a solução da lei exponencial conforme Equação 3.10. A regressão não linear foi obtida usando o método Quase-Newton do software Statistica 6.0 for Windows.

$$\frac{X - X_e}{X_o - X_e} = A * \exp^{-k*t} \quad (\text{Equação 3.10})$$

Onde: X = fração de umidade remanescente em qualquer tempo (g_{H_2O} / g_{SS}); X_e = umidade de equilíbrio do sólido (g_{H_2O} / g_{SS}) correspondente ao valor de umidade constante; X_o = umidade inicial do sólido no tempo zero (g_{H_2O} / g_{SS}).

A difusividade efetiva (D_{ef}) dos hidrolisados foi estimada segundo a Equação 3.11.

$$K = (D_{ef} * \pi^2) / (4Lo^2) \quad (\text{Equação 3.11})$$

Onde: K = valor da constante de secagem obtida conforme o item (XI); Lo = espessura da camada utilizada no processo de secagem que correspondeu a 5 mm.

Após o levantamento das curvas de secagem foi efetuada a secagem dos hidrolisados até a umidade comercial aproximada de 10% para posterior avaliação das suas propriedades funcionais e nutricionais.

3.2.6 Caracterização da funcionalidade dos hidrolisados enzimáticos de carne de frango

3.2.6.1 Propriedades de hidratação

3.2.6.1.1 Solubilidade e capacidade de retenção de água (CRA)

O procedimento para determinação da solubilidade e da capacidade de retenção de água foi de acordo com os métodos recomendados pela literatura (FONKWE e SINGH, 1996; MORR *et al.*, 1985; REGENSTEIN *et al.*, 1979) adaptadas as condições do laboratório. Foram preparadas dispersões protéicas a 1%, com variação de pH na faixa de 3 a 11. Pesou-se 500 mg de proteína em um béquer de 100 mL, adicionou-se 0,2 mL de NaCl 0,1M obtendo-se uma pasta homogênea. Em

seguida foi adicionada a solução tampão fosfato-citrato (MORITA, 1972) no correspondente pH até o volume de 50mL. A dispersão protéica foi mantida sob agitação por 30 minutos em agitador magnético (QUIMIS®, modelo 261-2). Logo após, transferiu-se a dispersão para tubos de centrifuga previamente pesados e centrifugou-se a dispersão por 30 minutos a 9000xg (centrífuga de tubos Biosystems, tipo MPW-350/350R). Alíquotas do sobrenadante foram tomadas para identificar a quantidade de proteínas solúveis, pelo método de Folin-Lowry descrito por PLUMMER (1978). A porcentagem de solubilidade foi calculada conforme a Equação 3.12.

$$\%S = \frac{A \times 50}{W \times \frac{P}{100}} \times 100 \quad (\text{Equação 3.12})$$

Onde: A = concentração de proteína no sobrenadante (mg/mL); W = Peso da amostra (mg); P = Quantidade de proteína total na amostra determinada por microKjedhal (Nx6,25) em mg.

O excesso de água nos tubos foi descartado por inversão dos tubos em papel absorvente e a amostra decantada foi submetida a pesagem no próprio tubo. A capacidade de retenção de água (CRA) foi determinada pela diferença entre o peso da amostra precipitada e a amostra inicial dividida pela quantidade de proteína presente na amostra, sendo descontado o teor de proteína solúvel presente no sobrenadante. O resultado foi expresso em gramas de água por grama de proteína, conforme a Equação 3.13.

$$CRA = \frac{W_h - W}{C - S} \quad (\text{Equação 3.13})$$

Onde: Wh = peso da amostra hidratada (g); W = peso inicial da amostra (g); C = quantidade de proteína na amostra determinada por microKjedhal (g); S = quantidade de proteína solúvel do sobrenadante (g) determinada por Folin-Lowry.

3.2.6.2 Propriedades de superfície

3.2.6.2.1 Capacidade emulsificante (CE)

A capacidade emulsificante (CE) dos hidrolisados protéicos foi determinada de acordo com o método descrito por OKEZIE e BELLO (1988), que constituiu em preparar uma suspensão contendo 1g de proteína com 34 mL de solução de NaCl 3%, em liquidificador doméstico (Walita Twist) por 30 segundos em velocidade baixa. Com

auxílio de uma bureta foram adicionados 30 mL de óleo vegetal de soja a uma vazão de 10mL/min sob agitação. A emulsão formada foi transferida para tubos de centrifuga e levados a um banho de água (QUIMIS®, modelo Q-215-2) a 85°C por 15 minutos. Após as amostras foram centrifugadas a 3000xg por 40 minutos em centrífuga de tubos Biosystems, tipo MPW-350/350R). O volume de óleo separado em cada amostra após a centrifugação foi transferido para uma proveta graduada e efetuada a leitura. A diferença entre a quantidade de óleo medido e a quantidade de óleo adicionado foi expressa como a quantidade de óleo emulsificado por grama de proteína contida na amostra, e calculada de acordo com a Equação 3.14.

$$CE = \frac{\text{quantidade de óleo emulsificado (mL)}}{\text{massa de proteína (g)}} \quad (\text{Equação 3.14})$$

3.2.6.2.2 Capacidade de retenção de óleo (CRO)

A capacidade de retenção de óleo (CRO) foi determinada de acordo com o método descrito por FONKWE e SINGH (1996) com modificações, onde um grama de amostra protéica foi misturada em 20 mL de óleo vegetal de soja e agitado por 10 minutos em agitador magnético (QUIMIS®, modelo 261-2) . A mistura foi então centrifugada a 9000xg por 15 min em centrífuga de tubos (Biosystems, tipo MPW-350/350R) e o volume de óleo não absorvido medido em proveta graduada. A quantidade de óleo absorvido foi obtida pela diferença entre a quantidade de óleo inicial e a quantidade de óleo não absorvida. A capacidade de retenção de óleo foi expressa como a quantidade de óleo retido por grama de proteína, conforme a Equação 3.15:

$$CRO = \frac{\text{quantidade de óleo absorvido (mL)}}{\text{peso da amostra (g)}} \times 100 \quad (\text{Equação 3.15})$$

3.2.6.2.3 Propriedades espumantes

A capacidade de formação de espuma (CFE) foi determinada por uma combinação dos métodos descritos por PHILIPS *et al.* (1990) e DIPAK e KUMAR (1986) citados por GLÓRIA e REGINATO-D'ARCE (2000), adaptado as condições do laboratório, onde foi preparada uma suspensão protéica de 5g de amostra com 100 mL de água. A suspensão foi agitada em liquidificador doméstico (Walita Twist) por 5 minutos sob agitação média, em seguida transferiu-se a dispersão para uma proveta

graduada de 250 mL. A capacidade de formação de espuma foi calculada como a % de aumento de volume após a agitação em relação ao volume inicial, conforme a Equação 3.16.

$$CFE = \frac{(B - A)}{A} \times 100 \quad (\text{Equação 3.16})$$

Onde: A = volume antes da agitação (mL); B = volume após a agitação (mL).

A determinação da estabilidade de espuma foi realizada através do repouso da amostra a temperatura ambiente (20-25°C) com leitura do volume após intervalos de 1, 5, 10, 30 e 60 minutos, calculada de acordo com a Equação 3.17.

$$EEs = \frac{V}{V_0} \times 100 \quad (\text{Equação 3.17})$$

Onde: V = volume final de espuma após cada intervalo de tempo (mL); V₀ = volume inicial de espuma formada (mL).

3.2.7 Digestibilidade *in vitro*

A avaliação nutricional dos hidrolisados de carne de frango foi realizada mediante a determinação da digestibilidade *in vitro*, proposta por SGARBIERI (1996). Inicialmente pesou-se uma quantidade de amostra que correspondesse ao equivalente a 0,5 g de proteína, preparou-se uma solução de 1,5 mg de pepsina por mL de HCl 0,1N e adicionou-se 15 mL desta solução à amostra, após adicionou-se 0,5 mL de solução de merthiolate incolor, homogeneizou-se bem e levou-se a banho-maria a 37 °C por 3 horas, com agitação periódica. Decorrido este tempo os tubos contendo as amostras foram resfriados e a solução foi ajustada a pH 8,0 com uma solução de NaOH 0,2N, utilizando um pHmetro de bancada.

Foi preparada uma solução de 0,5 mg de pancreatina por mL de tampão fosfato pH 8,0. Adicionou-se 10 mL da solução de pancreatina ao produto hidrolisado pela pepsina e levou-se novamente ao banho-maria a 37 °C, porém por 24 horas com agitação periódica. Após o tempo de hidrólise foram adicionados 5 mL de uma solução de TCA 5% a amostra e centrifugou-se por 15 minutos a 5000 xg para separação do material insolúvel, sendo o filtrado recolhido para posterior determinação do nitrogênio digerido, pelo método de microKjeldhal. A digestibilidade *in vitro* foi expressa como

porcentagem de nitrogênio digerido em relação ao nitrogênio total na amostra inicial, conforme Equação 3.18.

$$\text{Digestibilidade (\%)} = \frac{\text{Nitrogênio digerido} \times 100}{\text{Nitrogênio total na amostra}} \quad (\text{Equação 3.18})$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização Físico-química da Matéria-prima

4.1.1 Composição proximal da carne de frango

Dependendo do corte, a carne de frango apresenta diferentes valores em seus componentes, como podemos observar na Tabela 4.1, onde o teor de umidade, lipídios e cinzas são maiores na coxa do que no peito. Em relação à quantidade de proteínas o peito de frango apresenta um maior teor tanto em base úmida como em base seca. Este valor de porcentagem de proteínas foi utilizado para calcular a quantidade de carne de cada corte necessária para cada ensaio utilizado no planejamento experimental.

Tabela 4.1 - Composição proximal* de diferentes cortes de carne de frango** em base úmida e base seca.

Componente (%)	Peito (b.u) (média ± d.p)	Coxa (b.u) (média ± d.p)	Peito (b.s) (média ± d.p)	Coxa (b.s) (média ± d.p)
Umidade	74,98 ± 0,14	77,56 ± 0,62	-	-
Proteína	22,36 ± 0,57	16,82 ± 0,06	93,48 ± 1,92	80,62 ± 3,75
Lipídios	0,77 ± 0,29	3,34 ± 0,86	3,17 ± 1,05	15,86 ± 3,38
Cinzas	0,81 ± 0,25	0,90 ± 0,12	3,34 ± 0,87	4,27 ± 0,36

b.u = base úmida; b.s = base seca; d.p = desvio padrão.

* Resultados expressos como média e desvio padrão de 3 determinações.

**Sem pele e sem osso.

Os valores encontrados de composição proximal para os diferentes cortes de frango correspondem aos valores encontrados na literatura. Estes valores podem ser comparados com os resultados encontrados por HUALLANCO (2004) que avaliou a qualidade de cortes de frango da linhagem comercial Coob, com idade entre 48 e 49 dias, peso aproximado de 2 - 2,3 kg, encontrando valores de umidade de 75,4 e 76,9%, de proteína de 20,1 e 16,7%, de gordura em torno de 1,5 e 5,1% e cinzas de 1,1 e 1,0 para peito e coxa de frango respectivamente.

4.1.2 Valor de pH da carne de frango

Através da Tabela 4.2 podemos observar que os diferentes cortes de frango também apresentam diferenças em relação ao seu valor de pH.

Tabela 4.2 – Valores de pH em diferentes cortes de carne de frango.

Fonte	pH	
	Peito	Coxa
Experimental*	5,6 ± 0,1	6,6 ± 0,1
Literatura**	5,6-5,8	6,3

* Resultados expressos como média e desvio padrão de 3 determinações.

** HUALLANCO (2004) e OLIVO E OLIVO (2006).

O pH é um fator importante que pode definir a qualidade de um alimento, uma vez que pode ser afetado por reações que ocorrem após a morte do animal e indica a presença de microrganismos. De acordo com OLIVO E OLIVO (2006), o teor de ácido láctico formado no músculo, no momento da morte do animal, irá determinar a velocidade de instalação do *rigor mortis* e o pH final da carne. Sendo que, o valor deste pH final, dependerá diretamente da quantidade de glicogênio presente no músculo, no momento do sacrifício do animal. Devido a isto podemos observar que a coxa de frango, como é um músculo de maior atividade apresentará um menor teor de glicogênio no momento do abate, e por conseqüência, uma menor redução no seu valor de pH comparado com o peito de frango.

4.2 Resultados do Planejamento Experimental

4.2.1 Grau de hidrólise (GH) obtido com a enzima Alcalase sobre peito e coxa de frango

Os valores de grau de hidrólise obtidos com a enzima Alcalase utilizando peito e coxa de frango como substrato estão apresentados na Tabela 4.3. O GH apresentou uma variação de 20,93 a 57,42% quando foi utilizado peito de frango como substrato e de 18,62 a 38,79% com a coxa de frango. Observou-se que nos níveis $-\alpha$ e $+\alpha$, para a concentração de substrato (ensaios 9 e 10, respectivamente), fixando a concentração

de enzima e tempo em seus valores centrais, obtiveram-se o maior e o menor GH de todos os ensaios do planejamento com peito de frango. Para coxa de frango menor e maior GH foram obtidos a partir dos ensaios 2 e 7, respectivamente, que corresponde às condições inversas de concentração de substrato, concentração de enzima e tempo.

Tabela 4.3 - Valores de grau de hidrólise (GH) utilizando peito e coxa de frango como substrato nos ensaios de hidrólise com a enzima Alcalase.

ensaio	[S] (%p/v)	[E] (%p/p)	t (min)	GH (%)	
				PEITO	COXA
1	-1 (5)	-1 (4)	-1 (60)	34,44	33,98
2	1 (10)	-1 (4)	-1 (60)	24,32	18,62
3	-1 (5)	1 (8)	-1 (60)	45,22	36,36
4	1 (10)	1 (8)	-1 (60)	25,61	19,35
5	-1 (5)	-1 (4)	1 (120)	35,80	37,48
6	1 (10)	-1 (4)	1 (120)	23,96	23,74
7	-1 (5)	1 (8)	1 (120)	47,27	38,79
8	1 (10)	1 (8)	1 (120)	25,92	25,71
9	-1,68 (3,3)	0 (6)	0 (90)	57,42	38,44
10	1,68 (11,7)	0 (6)	0 (90)	20,93	19,61
11	0 (7,5)	-1,68 (2,9)	0 (90)	29,20	29,78
12	0 (7,5)	1,68 (9,1)	0 (90)	29,98	29,82
13	0 (7,5)	0 (6)	-1,68 (39,6)	26,27	26,34
14	0 (7,5)	0 (6)	1,68 (140,4)	32,26	33,50
15	0 (7,5)	0 (6)	0 (90)	33,40	28,99
16	0 (7,5)	0 (6)	0 (90)	33,04	30,70
17	0 (7,5)	0 (6)	0 (90)	32,86	29,98

[S] = concentração de substrato; [E] = concentração de enzima; t = tempo; GH = grau de hidrólise.

Constatamos que quando se utilizou coxa de frango como substrato, obtiveram-se na maioria dos ensaios valores menores de GH comparado com os hidrolisados de peito, sendo que o maior GH com coxa foi alcançado com a maior concentração de enzima e maior tempo (ensaio 7) do que as condições do ensaio 9 que apresentou o maior GH obtido com peito. Este comportamento do GH em relação à matéria-prima pode ser devido ao maior teor de lipídeos presente na coxa do que no peito de frango que dificultaria a ação da enzima sobre as proteínas. SLIZYTE *et al.* (2005) analisaram a composição de diferentes frações obtidas após a hidrólise de bacalhau (*Gadus morhua*) com as enzimas Flavourzyme e Neutralse, observaram que uma matéria-prima contendo elevada quantidade de lipídios resultava em uma menor

quantidade de proteína solúvel. Também relataram que quantidade de lipídios na matéria-prima é importante para o processo de hidrólise, pois uma matéria-prima contendo uma quantidade de lipídeos relativamente alta poderia formar complexos proteína/lipídeo, sendo que estes complexos pareciam ser mais resistentes à quebra enzimática. CENTENARO (2007) que obteve valores de GH entre 12,2 e 43,7% a partir de um planejamento experimental utilizando a enzima Alcalase em corvina (*Micropogonias furnieri*) em condições semelhantes ao nosso trabalho (concentração de substrato variando de 3 a 7%; concentração de enzima variando de 4 a 8%; tempo de hidrólise de 1 hora). GOVINDARAJU e SRINIVAS (2004) hidrolisaram proteínas de amendoim (*Arachis hypogaea L.*) com a enzima Alcalase, em condições de pH e temperatura de 7,8 a 55°C respectivamente, [S] de 5% e [E] variando de 1 a 5% (p/p) em intervalos de tempo de 5 a 240 min. Obtiveram valores de GH que variaram na faixa de 2,4 a 18,6%. Já LICEAGA-GESUALDO e LI-CHAN (1999) obtiveram valores acima de 35% de GH com a enzima Alcalase em 60 minutos de hidrólise das proteínas de arenque (*Clupea harengus*). SHAHIDI *et al.* (1995) produziram proteína hidrolisada de capelin (*Mallotus villosus*), obtendo valores de GH acima de 20% em 120 minutos de hidrólise com a enzima Alcalase. SANTOS (2006) avaliou o GH obtido com a enzima Alcalase em cabrinha (*Prionotus punctatus*) e obteve valores que variaram na faixa de 18,6 e 34,7% variando a concentração de substrato em elevados níveis (500mg/mL a 1500 mg/mL), fixando o tempo de hidrólise em 60 minutos de hidrólise e 0,5g de enzima/g de pescado.

4.2.1.1 Análise dos efeitos principais e suas interações para a resposta grau de hidrólise com a enzima Alcalase sobre peito e coxa de frango

O tratamento estatístico dos dados obtidos permitiu a análise dos efeitos dos fatores [S], [E] e tempo de reação, assim como suas interações no grau de hidrólise para um nível de confiança de 95%. Através das Tabelas 4.4 e 4.5 e da Figura 4.1 podemos observar os efeitos de cada variável estudada e suas interações no GH das proteínas da carne de frango.

Tabela 4.4 – Efeitos estimados para o grau de hidrólise das proteínas de peito de frango com a enzima Alcalase.

Variáveis	Efeitos	Erro Padrão	valor t	valor p
Média	33,24	0,0667	498,64	<0,0001*
[S]	-17,15	0,1488	-115,27	0,0001*
[E]	2,88	0,1488	19,34	0,0027*
t	3,02	0,1488	20,30	0,0024*
[S] x [E]	-6,54	0,1944	-33,67	0,0009*
[S] x t	0,93	0,1944	4,78	0,0411*
[E] x t	-1,46	0,1944	-7,49	0,0174*

*significativos ($p < 0,05$)

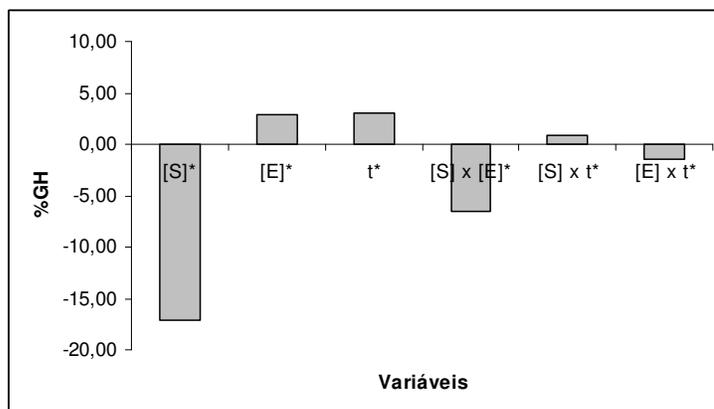
Tabela 4.5 – Efeitos estimados para o grau de hidrólise das proteínas de coxa de frango com a enzima Alcalase.

Variáveis	Efeitos	Erro Padrão	valor t	valor p
Média	29,48	0,2082	141,63	<0,0001*
[S]	-13,31	0,4647	-28,65	0,0012*
[E]	0,94	0,4647	2,03	0,1791
t	4,31	0,4647	9,28	0,0114*
[S] x [E]	-0,25	0,6069	-0,41	0,7242
[S] x t	1,39	0,6069	2,28	0,1497
[E] x t	0,04	0,6069	0,07	0,9490

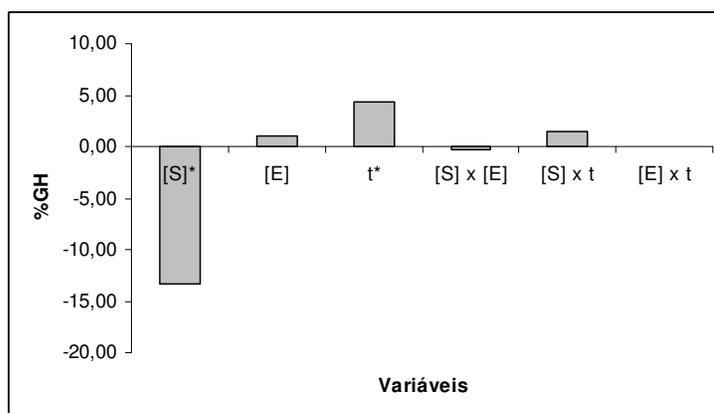
*significativos ($p < 0,05$)

Através das Tabelas 4.4 e 4.5 podemos observar que todas as variáveis estudadas e suas interações apresentaram uma influência significativa no GH das proteínas de peito de frango, enquanto que na hidrólise das proteínas da coxa de frango somente as variáveis principais de concentração de substrato e tempo apresentaram uma influência significativa nas faixas estudadas no processo, sendo que a concentração de enzima não apresentou um efeito significativo. A Figura 4.1 apresenta graficamente os efeitos obtidos das variáveis estudadas no grau de hidrólise das proteínas de peito e coxa de frango utilizando a enzima Alcalase. Tanto na hidrólise de peito, como na de coxa de frango a concentração de substrato [S] demonstrou ser a variável com maior influência no processo hidrolítico, apresentando um efeito negativo em ambos os casos, ou seja, quando a [S] no meio passou de 5% para 10%, ocorreu um efeito negativo no GH ocasionando uma diminuição no valor de 17,15% e 13,31% em peito e coxa de frango respectivamente. CENTENARO (2007) e SANTOS (2006) também verificaram um efeito negativo para a concentração de substrato no GH das proteínas de pescado. Resultados semelhantes foram

encontrados por KRISTINSSON e RASCO (2000^a) que em um estudo detalhado sobre proteína hidrolisada de pescado relataram que a [S] apresentou um efeito negativo na recuperação das proteínas, eles citaram LINDER *et al.* (1995) que observaram que acima de 8% a concentração de substrato no sistema, indiferentemente da concentração de enzima, parecia ter um efeito inibidor na proteína recuperada.



(a)



(b)

Figura 4.1 - Efeitos da [S], da [E], do tempo e de suas interações no GH dos hidrolisados enzimáticos de peito (a) e coxa de frango (b) utilizando a enzima Alcalase. *significativos ($p < 0,05$)

De acordo com FURLONG (2000) quando a concentração de substrato é baixa, nem todas as moléculas de enzima estão combinadas com o substrato, portanto um máximo de velocidade pode ser encontrado para cada quantidade de enzima. Se a concentração de substrato é alta, todas as moléculas de enzima estão complexadas com o substrato, e para cada molécula de produto formado só uma molécula de

substrato é ligada à enzima, isto quer dizer que a velocidade da reação é constante. Em nosso trabalho, elevadas concentrações de substrato pareceram apresentar um efeito inibidor no GH das proteínas. Este tipo de inibição causada pela elevada concentração de substrato, conforme WHITAKER (1994), citado por TARDIOLI (2003), comporta-se como uma inibição incompetitiva, pois uma segunda molécula de substrato liga-se em um local próximo ao sítio ativo da enzima, reduzindo a velocidade inicial de reação, impedindo que a primeira molécula se ligue corretamente ao sítio ativo ou por impedir que ela seja transformada em produto. O estudo cinético da hidrólise enzimática neste tipo de reação segundo KRISTINSSON e RASCO (2000^a) é muito complicado devido aos vários tipos de ligações peptídicas susceptíveis ao ataque enzimático, diferindo em sua vulnerabilidade durante o processo hidrolítico.

A concentração de enzima apresentou efeito positivo em ambos os casos. Esta relação positiva de [E] com o grau de hidrólise era esperada, porém pretendia-se verificar se esta variável apresentaria um aumento significativo na faixa de concentração estudada, já que o aumento da enzima permitirá uma maior cisão das cadeias protéicas, aumentando a quantidade de proteínas de menor tamanho molecular e o GH do produto obtido. KRISTINSSON e RASCO (2000^a) também relataram que pelo aumento da concentração de protease ocorre um aumento na extensão da hidrólise. SURÓWAKA e FIK (1992) também relataram que aumentando a adição da enzima, poderia elevar-se o rendimento do processo, mas também aumentaria o custo.

Na hidrólise de coxa de frango com Alcalase a [E] não apresentou um efeito significativo a um nível de 95% de confiança, indicando que a quantidade de enzima adicionada ao meio de 4% em relação à massa de proteína, promove valores semelhantes de GH quando se utiliza uma quantidade maior de enzima até 8%. SHAHIDI *et al.* (1995) notaram que nenhum aumento na liberação de hidrolisado solúvel era observada quando quantidades adicionais de enzima eram incorporadas na mistura de reação durante a fase estacionária de hidrólise. Justificaram que a possível inibição da hidrólise protéica aconteceu pela presença de produtos ou clivagem total dos peptídeos disponíveis para a enzima. Uma alta concentração de peptídeos solúveis na mistura de reação reduz a taxa de hidrólise e a recuperação de proteínas solúveis.

O GH aumentou com o aumento do tempo de hidrólise, como também era esperado, apresentando um efeito positivo e significativo, nas condições estudadas com ambos os substratos, o que indica que o valor de GH apresenta um aumento

significativo, a um nível de confiança de 95%, quando aumentamos o tempo de hidrólise de 60 para 120 minutos. LICEAGA-GESUALDO e LI-CHAN (1999) observaram que a hidrólise de tecido de arenque era rapidamente convertida em um líquido viscoso e que 24% de GH era obtido com 20 minutos de incubação, com a enzima Alcalase, a pH 8.0 e 50 °C. A reação era detida depois de 60 minutos, chegando a 36%. De acordo com MACKIE (1982), citado por estes autores, a enzima é adsorvida nas partículas suspensas, sendo que a hidrólise das ligações susceptíveis ao ataque enzimático, ocorre simultaneamente. Após uma rápida fase inicial de hidrólise, a taxa de hidrólise tende a decair, entrando em uma fase estacionária. Este fato também foi reportado por KRISTINSSON e RASCO (2000^a) que observaram que a hidrólise enzimática de pescado era caracterizada por uma fase inicial rápida, durante a qual um grande número de ligações peptídicas eram hidrolisadas, depois disto a taxa de hidrólise enzimática diminuía, chegando a uma fase estacionária onde aparentemente não ocorria nenhuma hidrólise. Estes autores citam ARCHER *et al.* (1973), que estudaram a cinética de hidrólise enzimática de concentrado protéico de pescado e verificaram que a enzima fica inicialmente adsorvida na superfície da proteína, com uma taxa inicial de reação proporcional a área superficial exposta do substrato para a fase aquosa. A cinética global foi descrita como uma seqüência de dois processos de primeira ordem, um inicial, de reação rápida na qual cadeias polipeptídicas livremente soltas eram clivadas de partículas insolúveis de proteína, e um segundo, uma reação mais lenta na qual a proteína central mais compacta era digerida. Um estudo cinético do processo é bastante complicado devido aos vários tipos de ligações peptídicas envolvidas que apresentam uma vulnerabilidade diferente ao ataque das enzimas durante a hidrólise.

Em relação às interações de cada variável estudada no processo, todas as variáveis foram significativas para a hidrólise da enzima Alcalase com peito de frango. Ou seja, quando passamos duas variáveis ao mesmo tempo, do menor para o maior nível, estas apresentam uma interação significativa no valor de GH das proteínas de peito de frango. A interação da concentração de substrato com o tempo apresentou um efeito positivo no GH. As interações da [S] com a [E] e de [E] com o tempo apresentaram um efeito negativo no GH das proteínas. Nos hidrolisados de coxa de frango não se verificou efeito estatisticamente significativo da interação das variáveis em estudo.

4.2.1.2 Verificação do modelo matemático para o grau de hidrólise em peito de frango com a enzima Alcalase

Para verificação do modelo matemático realizou-se uma análise de variância (Tabela 4.6) com os valores de GH obtidos com a enzima Alcalase para peito de frango considerando somente os efeitos significativos.

Tabela 4.6 – Análise de variância dos valores de GH obtidos com a enzima Alcalase em peito de frango a um nível de confiança de 95%.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}
Regressão	1370,27	8	171,28	21,01
Resíduos	65,22	8	8,15	
F. ajuste	65,07	6		
Erro puro	0,15	2		
Total	1435,49			

Onde: SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F_{calc} = teste de Fisher

F_{tabelado} = 3,44

Coefficiente de determinação R² = 0,95

O modelo matemático obteve um coeficiente de determinação de 0,95 e um valor de F calculado de 21,01. De acordo com a literatura, um modelo tem significação estatística quando o valor de F calculado é pelo menos 3 a 5 vezes maior do que o tabelado (KALIL *et al.*, 2000; NETO *et al.*, 1996). Como o F calculado apresentou um valor cerca de 6 vezes maior que o valor de F tabelado, pode-se afirmar que o modelo é suficientemente confiável para predizer o GH de qualquer combinação das variáveis independentes nos níveis estudados. O elevado valor do coeficiente de determinação demonstra que 95% do comportamento pode ser explicado pelo modelo. Com os valores de coeficientes de regressão obtidos pela análise (Tabela A.1 em anexo), o modelo apresentou a seguinte equação:

$$\text{GH}(\%) = 33,09 - 9,10*[S] + 2,19*[S]^2 + 1,97*[E] - 1,20*[E]^2 + 0,98*t - 1,32*t^2 - 2,37*[S]*[E] - 0,43*[S]*t \quad (\text{Equação 4.1})$$

Onde: GH = grau de hidrólise; [S] = concentração de substrato; [E] = concentração de enzima e t = tempo.

O modelo polinomial mostra que os termos lineares e quadráticos de [S], [E] e tempo contribuem para a resposta, assim como as interações da [S] com a [E] e com o tempo. Portanto, foi possível a construção das superfícies de resposta e suas respectivas curvas de contorno (Figura 4.2), a partir do modelo obtido, com as variáveis que apresentaram influência significativa sobre o grau de hidrólise, permitindo a visualização do comportamento da hidrólise enzimática das proteínas do peito de frango com a enzima Alcalase.

Através da Figura 4.2 observamos que os maiores valores de GH foram obtidos em: baixas [S], em torno de 3,3%; em [E] entre 6 e 9%; e tempos de hidrólise entre 90 e 120 minutos. Comportamentos semelhantes foram encontrados por SURÓWKA e FIK (1992) que observaram que aumentando a quantidade de protease adicionada ao meio produzia um aumento na taxa de hidrólise que não era linear em função da adição de enzima. BEDDOWS e ARDESHIR (1979) produziram proteína solúvel de pescado para a aplicação em molhos e observaram que aumentando a [E] aumentava a taxa de conversão de proteína, mas a relação não era diretamente proporcional. GBOGOURI *et al.* (2004) estudaram a hidrólise de salmão com a enzima Alcalase e em uma [S] de 50%, eles observaram que a [E] apresentava um efeito linear significativo nas condições estudadas, sendo que para o maior valor de GH alcançado por eles (17,2%) a condição ideal de [E] era de 5,2%. KRISTINSSON e RASCO (2000^b) estudaram a cinética enzimática de hidrolisados de salmão do Atlântico (*Salmo solar*) com diversas proteases alcalinas e concluíram que a enzima Alcalase foi a que apresentou a melhor relação custo x eficiência, possuindo o menor custo por atividade enzimática em todos os GH obtidos por eles.

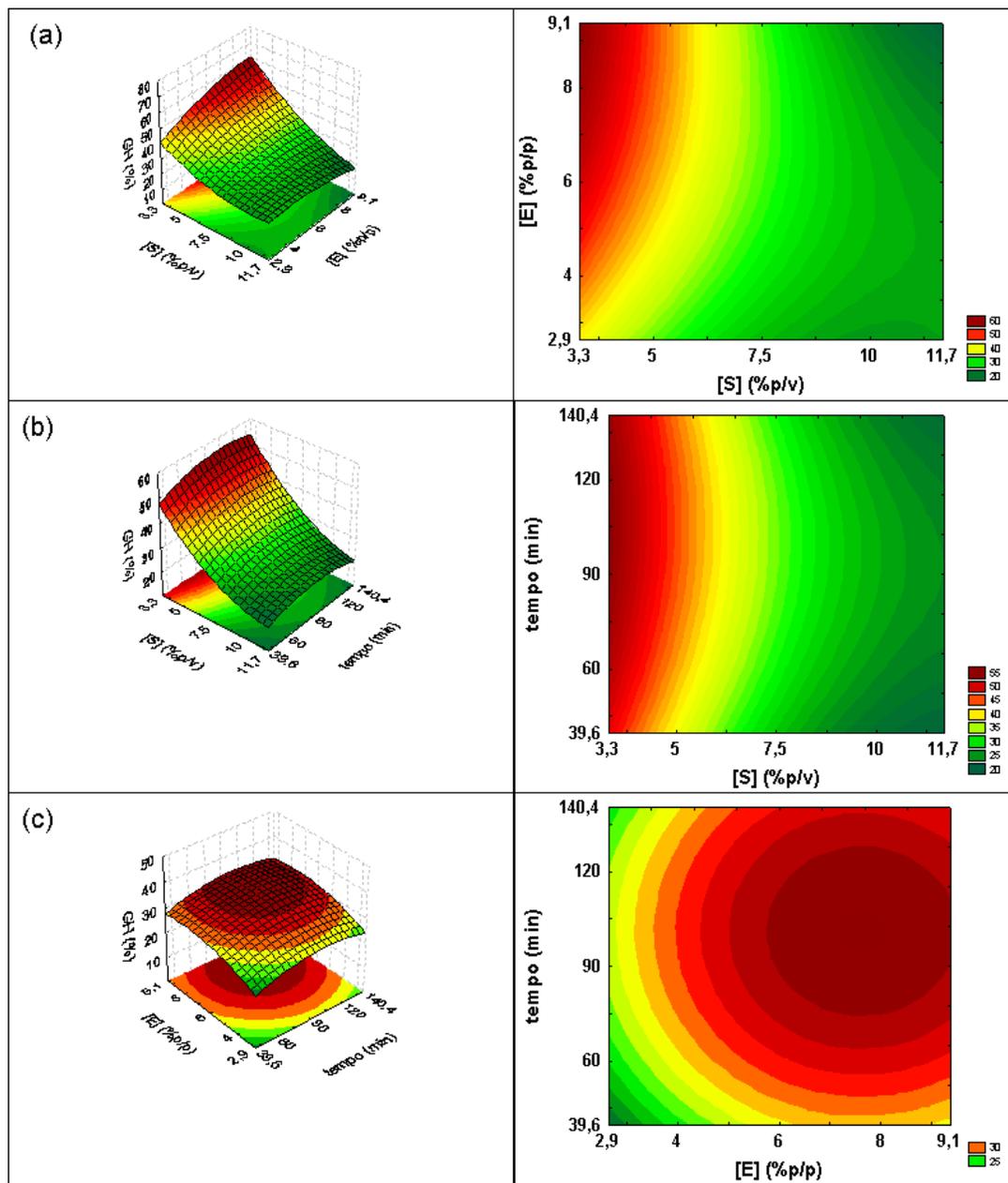


Figura 4.2 – Superfícies de resposta e suas respectivas curvas de contorno do grau de hidrólise (GH) em função da [S] e da [E] (a), da [S] e do tempo (b), [E] e do tempo (c) das proteínas de peito de frango com a enzima Alcalase.

4.2.1.3 Verificação do modelo matemático para o grau de hidrólise em coxa de frango com a enzima Alcalase

Para verificação do modelo matemático realizou-se uma análise de variância (Tabela 4.7) com os valores de GH obtidos com a enzima Alcalase para coxa de frango considerando somente os efeitos significativos.

Tabela 4.7 – Análise de variância dos valores de GH obtidos com a enzima Alcalase em coxa de frango a um nível de confiança de 95%.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}
Regressão	667,90	2	333,95	196,44
Resíduos	23,76	14	1,70	
F. ajuste	22,29	12		
Erro puro	1,47	2		
Total	691,66			

Onde: SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F_{calc} = teste de Fisher

F_{tabelado} = 3,74

Coefficiente de determinação R² = 0,97

O modelo matemático obteve um coeficiente de determinação de 0,97 e um valor de F calculado 196,77. Como o F calculado apresentou um valor 52,5 vezes maior que o valor de F tabelado, pode-se afirmar que o modelo é preditivo. O elevado valor do coeficiente de determinação demonstra que 97% do comportamento pode ser explicado pelo modelo. Com os valores de coeficientes de regressão obtidos pela análise (Tabela A.2 em anexo), o modelo apresentou a seguinte equação:

$$GH(\%) = 29,48 - 6,66*[S] + 2,16*t \quad (\text{Equação 4.2})$$

Onde: GH = grau de hidrólise; [S] = concentração de substrato e t = tempo.

O modelo linear mostra que somente os termos lineares de [S] e t contribuem para a resposta. Portanto, foi possível a construção da superfície de resposta e de contorno (Figura 4.3) a partir do modelo obtido com as variáveis que apresentaram influência significativa sobre o grau de hidrólise, permitindo a visualização do comportamento da hidrólise enzimática das proteínas da coxa de frango com a enzima Alcalase.

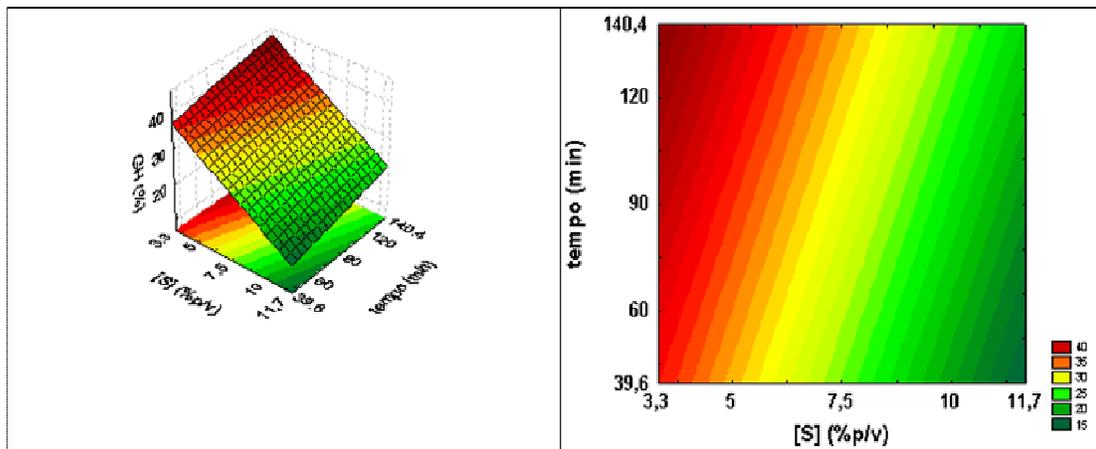


Figura 4.3 – Superfície de resposta e sua respectiva curva de contorno do grau de hidrólise em função da [S] e do tempo das proteínas de coxa de frango com a enzima Alcalase.

Através da Figura 4.3 observamos que os maiores valores de GH foram obtidos em elevados tempos de hidrólise e baixas concentrações de substrato. SURÓWKA e FIK (1992), em sua pesquisa sobre a hidrólise de proteínas de cabeças de frango com a enzima Neutrase, reportaram que a taxa de hidrólise aumentava quando a quantidade de água no meio de reação aumentava e a concentração de substrato diminuía. O que também pode explicar os menores valores de GH com coxa de frango, uma vez que a quantidade protéica era menor nesse substrato do que no peito, logo se fazia necessário uma maior quantidade de carne de coxa para manter a mesma concentração de proteína em relação ao peito, reduzindo a quantidade de solução aquosa no meio de reação. De acordo com BELITZ e GROSCH (1997), as enzimas devem apresentar um certo grau de hidratação para serem ativas, o que também pode ter influenciado o efeito negativo da concentração de substrato na faixa estudada em nosso trabalho. Este autor mediante espectroscopia IR e RMN (infravermelho e ressonância magnética nuclear, respectivamente) acompanhou a hidratação da lisoleucina e observou que primeiro se hidratavam os grupos carregados e depois os grupos polares sem carga das cadeias laterais e que aumentando a hidratação, conduzia a um recobrimento monomolecular de toda a superfície disponível da enzima, aumentando a atividade e favorecendo a difusão do substrato para o centro ativo da enzima.

4.2.2 Grau de hidrólise (GH) obtido com a enzima Flavourzyme sobre peito e coxa de frango

Os valores obtidos de GH com a enzima Flavourzyme utilizando peito e coxa de frango como substrato estão apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Valores de GH obtidos com a enzima Flavourzyme utilizando peito e coxa de frango como substrato.

ensaio	[S] (%p/v)	[E] (%p/p)	t (min)	GH (%)	
				PEITO	COXA
1	-1 (5)	-1 (4)	-1 (60)	23,77	12,32
2	1 (10)	-1 (4)	-1 (60)	17,22	8,30
3	-1 (5)	1 (8)	-1 (60)	22,78	20,81
4	1 (10)	1 (8)	-1 (60)	22,23	16,98
5	-1 (5)	-1 (4)	1 (120)	25,68	14,52
6	1 (10)	-1 (4)	1 (120)	19,46	10,32
7	-1 (5)	1 (8)	1 (120)	27,29	22,54
8	1 (10)	1 (8)	1 (120)	26,15	19,23
9	-1,68 (3,3)	0 (6)	0 (90)	40,47	20,28
10	1,68 (11,7)	0 (6)	0 (90)	20,94	14,39
11	0 (7,5)	-1,68 (2,9)	0 (90)	21,38	11,89
12	0 (7,5)	1,68 (9,1)	0 (90)	26,83	18,34
13	0 (7,5)	0 (6)	-1,68 (39,6)	21,32	14,63
14	0 (7,5)	0 (6)	1,68 (140,4)	28,07	20,46
15	0 (7,5)	0 (6)	0 (90)	24,27	17,71
16	0 (7,5)	0 (6)	0 (90)	25,16	17,17
17	0 (7,5)	0 (6)	0 (90)	25,64	18,14

Onde: [S] = concentração de substrato, [E] = concentração de enzima; t = tempo; GH = grau de hidrólise.

Os valores de GH obtidos com a enzima Flavourzyme em peito de frango variaram de 17,22 a 40,47% e de 8,30 a 22,54 em coxa de frango. Comparando as condições de hidrólise, para peito de frango, dos ensaios de baixo GH (ensaio 2) e de alto GH (ensaio 9) observou-se que o maior valor de GH era obtido em condições de menores concentrações de substrato (3,3%), com concentrações de enzima e tempos de reação fixados em seus pontos centrais (6% e 90 minutos, respectivamente). Enquanto o menor GH era obtido com a concentração de substrato em seu nível superior (10%) e concentração de enzima e tempo em seus níveis inferiores (4% e 60 minutos, respectivamente). Para a coxa de frango o maior valor de GH foi obtido em condições de concentração de substrato fixadas em seu nível inferior (5%) e

concentração de enzima e tempo em seus níveis superiores (8% e 120 minutos, respectivamente), enquanto o menor valor de GH foi obtido nas mesmas condições que o menor GH para o peito de frango.

Todos os ensaios realizados com a enzima Flavourzyme em peito de frango apresentaram maiores valores de GH do que os ensaios com coxa. Verificou-se uma diferença bem mais acentuada do que a observada nos ensaios com a enzima Alcalase. Esta diferença ocasionada pelo tipo de substrato pode ser devida ao conteúdo de colágeno presente em maior quantidade na coxa de frango do que no peito de frango, conforme determinado por NOWSAD *et al.* (1999) que determinaram que o teor de colágeno em coxas de frango era cerca de 9,3% podendo chegar a 14,7% em animais velhos, enquanto que para peito de frango estes valores foram menores, cerca de 3,9% e de 4,9% em animais velhos. Segundo GILDBERG (2002) a enzima Alcalase possui alguma atividade colagenosa, o que justifica a maior diferença encontrada nos valores de GH com a enzima Flavourzyme em peito e coxa de frango.

Nossos resultados podem ser comparados com aqueles obtidos por SANTOS (2007) que a partir de um planejamento experimental variando o pH (6,5-7,5), a concentração de enzima (10 – 30 mg/g) e de substrato (500 – 1500 mg/mL), encontraram valores de GH na faixa de 14,3% e 30,0% em 60 minutos de hidrólise com a enzima Flavourzyme em carne de cabrinha (*Prionotus punctatus*). ROMAN e SGARBIERI (2005) utilizaram a enzima Flavourzyme para a obtenção de hidrolisados de caseína bovina coagulada, em uma suspensão de 8% de proteína, uma relação E/S de 1:9, pH 7,0 a 38°C; eles obtiveram hidrolisados com valores de GH na faixa de 5,7 a 35,8%. CANDIDO E SGARBIERI (2003) hidrolisaram as proteínas de tilapia do Nilo (*Oreochromus niloticus*) com a enzima Flavourzyme em pH 7 a 50°C, 12% de [S] e 1% de [E], e obtiveram valores de GH na faixa de 2,5 a 45%. CLEMENTE *et al.* (1999) avaliaram a proteína hidrolisada de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) com as enzimas Alcalase e Flavourzyme e observaram que o GH com estas enzimas não era maior que 27%. No entanto, estes mesmos autores, ainda relatam que a combinação de ambas as enzimas em um processo de duas etapas resultava em uma proteína hidrolisada final com GH acima de 50%, confirmando que o uso de Alcalase facilitava a ação da Flavourzyme, na segunda etapa, para obter uma hidrólise mais extensa.

4.2.2.1 Análise dos efeitos principais e suas interações para a resposta grau de hidrólise com a enzima Flavourzyme

As Tabelas 4.9 e 4.10 apresentam os efeitos de cada variável estudada e suas interações no GH das proteínas de peito e de coxa, obtidos com a enzima Flavourzyme. A Figura 4.4 apresenta graficamente os efeitos obtidos das variáveis estudadas no grau de hidrólise das proteínas de peito e coxa de frango utilizando a enzima Flavourzyme.

Tabela 4.9 - Efeitos estimados para o grau de hidrólise em peito de frango com a enzima Flavourzyme.

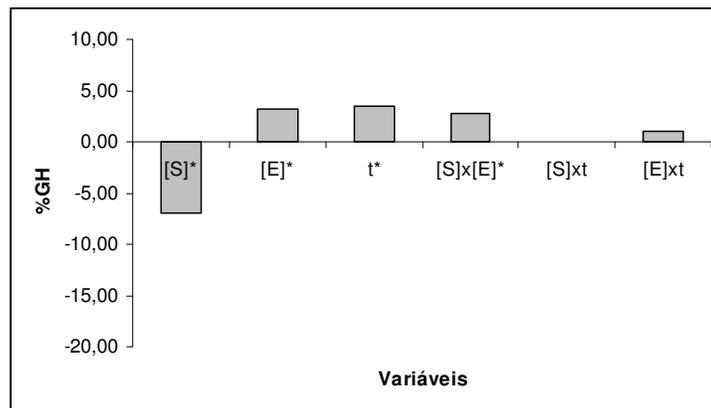
Variáveis	Efeitos	Erro Padrão	valor t	valor p
Média	24,63	0,1681	146,47	<0,0001*
[S]	-6,93	0,3753	-18,45	0,0029*
[E]	3,15	0,3753	8,39	0,0139*
t	3,51	0,3753	9,34	0,0113*
[S] x [E]	2,77	0,4902	5,65	0,0299*
[S] x t	-0,06	0,4902	-0,13	0,9079
[E] x t	1,07	0,4902	2,18	0,1609

*significativos (p<0,05)

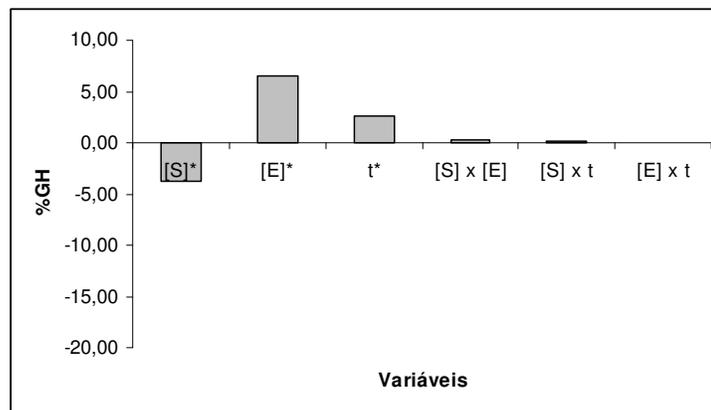
Tabela 4.10 - Efeitos estimados para o grau de hidrólise em coxa de frango com a enzima Flavourzyme.

Variáveis	Efeitos	Erro Padrão	valor t	valor p
Média	16,35	0,1181	138,51	0,0001*
[S]	-3,70	0,2636	-14,04	0,0050*
[E]	6,58	0,2636	24,97	0,0016*
t	2,64	0,2636	10,01	0,0098*
[S] x [E]	0,27	0,3442	0,78	0,5151
[S] x t	0,09	0,3442	0,25	0,8227
[E] x t	-0,06	0,3442	-0,18	0,8762

*significativos (p<0,05)



(a)



(b)

Figura 4.4 - Efeitos da [S], da [E], do tempo e de suas interações no GH dos hidrolisados enzimáticos de peito (a) e coxa de frango (b) utilizando a enzima Flavourzyme. *significativos ($p < 0,05$)

Assim como foi observado com a enzima Alcalase, a [S] também apresentou um efeito negativo no GH das proteínas do peito e coxa de frango com a enzima Flavourzyme. Sendo que na hidrólise das proteínas de peito de frango esta foi a variável que apresentou a maior influência no GH. Quando a [S] passou do nível -1 para o +1 acarretou em uma diminuição de 6,93% e 3,70% no GH dos hidrolisados elaborados com peito e coxa de frango, respectivamente. SLIZYTE *et al.* (2005) estudaram a hidrólise de bacalhau (*Gadus morhua*) com as enzimas Flavourzyme e Neutrase e verificaram haver uma forte influência negativa no nitrogênio recuperado com o aumento da [S], devido a que o potencial de produtos que inibiam a reação enzimática aumentava com o aumento da concentração de substrato no processo de

hidrólise. Consequentemente, fazia-se necessária a adição de água na mistura de hidrólise para aumentar a proteína recuperada.

A [E] e o tempo apresentaram efeitos positivos no GH, sendo a [E] a variável de maior influência no GH das proteínas da coxa de frango. Em relação às interações de cada variável, apenas a interação da [S] com a [E] na hidrólise das proteínas do peito de frango apresentou um efeito significativo a um nível de 95% de confiança. SOARES *et al.* (2000) avaliaram a influência de diversas proteases comerciais na solubilização hidrolítica de carne de frango mecanicamente separada, e observaram que a solubilização das proteínas cessava após 3 horas de proteólise nas condições estudadas. Também observaram que em muitos casos, quando a [E] era dobrada, havia um aumento significativo na solubilização das proteínas. CÂNDIDO E SGARBIERI (2003) após testarem diferentes enzimas escolheram a Flavourzyme para hidrolisar as proteínas miofibrilares de tilápia do Nilo. Eles observaram que a taxa de hidrólise era elevada nos primeiros 30 minutos, mas decaía significativamente após este tempo de incubação. E salientaram que esta queda na taxa de hidrólise poderia ser explicada pelos seguintes fenômenos: (a) diminuição de peptídeos disponíveis para hidrólise; (b) possível inibição enzimática pelos produtos formados da reação; (c) parcial desnaturação da enzima.

4.2.2.2 Verificação do modelo matemático para o GH em peito de frango com a enzima Flavourzyme

A Tabela 4.11 apresenta a análise de variância realizada para verificação do modelo matemático, utilizando os valores de GH obtidos com a enzima Flavourzyme para peito de frango, considerando somente os efeitos significativos. Através da análise estatística dos dados, podemos verificar que o grau de hidrólise das proteínas de peito de frango com a enzima Flavourzyme não apresentou um modelo matemático preditivo relacionando a variáveis estudadas, visto que o valor de F calculado não foi suficientemente maior do que o tabelado.

Isto não torna os resultados inválidos, pois se constatou que aumentando a [E] e o tempo ou reduzindo a [S], é possível elevar os valores de GH. Como se pretendia obter faixas distintas de GH, para verificar a influência do mesmo nas propriedades funcionais e nutricionais dos produtos obtidos a partir de diferentes cortes de carne de frango, os resultados encontrados foram satisfatórios para este tipo de estudo, uma vez que não se pretendia uma maximização na resposta dessa variável.

Tabela 4.11 – Análise de variância dos valores de GH obtidos com a enzima Flavourzyme em peito de frango a um nível de confiança de 95%.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}
Regressão	307,17	7	43,88	3,89
Resíduos	101,59	9	11,29	
F. ajuste	100,63	7		
Erro puro	0,96	2		
Total	408,77			

Onde: SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F_{calc} = teste de Fisher

F_{tabelado} = 3,29

Coefficiente de determinação R² = 0,75

4.2.2.3 Verificação do modelo matemático para o GH em coxa de frango com a enzima Flavourzyme

A Tabela 4.12 apresenta a análise de variância realizada para verificação do modelo matemático utilizando os valores de GH obtidos com a enzima Flavourzyme para coxa de frango, considerando somente os efeitos significativos.

Tabela 4.12 – Análise de variância dos valores de GH obtidos com a enzima Flavourzyme em peito de frango a um nível de confiança de 95%.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}
Regressão	230,94	4	57,74	27,49
Resíduos	25,26	12	2,10	
F. ajuste	24,78	10		
Erro puro	0,47	2		
Total	256,20			

Onde: SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F_{calc} = teste de Fisher

F_{tabelado} = 3,26

Coefficiente de determinação R² = 0,90

Conforme os valores observados na Tabela 4.12 constatamos que o modelo matemático apresentou um valor 8,4 vezes maior que o valor de F tabelado, juntamente com um coeficiente de determinação elevado, o que demonstra que 90% do comportamento pode ser explicado pelo modelo. Com os valores de coeficientes de

regressão obtidos pela análise (Tabela A.3 em anexo), o modelo obtido apresentou a seguinte equação:

$$GH(\%) = 17,15 - 1,85*[S] + 3,29*[E] - 0,99*[E]^2 + 1,32*t \quad (\text{Equação 4.3})$$

Onde: GH = grau de hidrólise; [S] = concentração de substrato; [E] = concentração de enzima e t = tempo.

O modelo polinomial mostra que os termos lineares de [S], [E] e tempo, juntamente com o termo quadrático de [E] contribuem para a resposta. Portanto, foi possível a construção das superfícies de resposta e suas respectivas curvas de contorno (Figura 4.5), a partir do modelo obtido com as variáveis que apresentaram influência significativa sobre o grau de hidrólise, permitindo a visualização do comportamento da hidrólise enzimática das proteínas da coxa de frango com a enzima Flavourzyme.

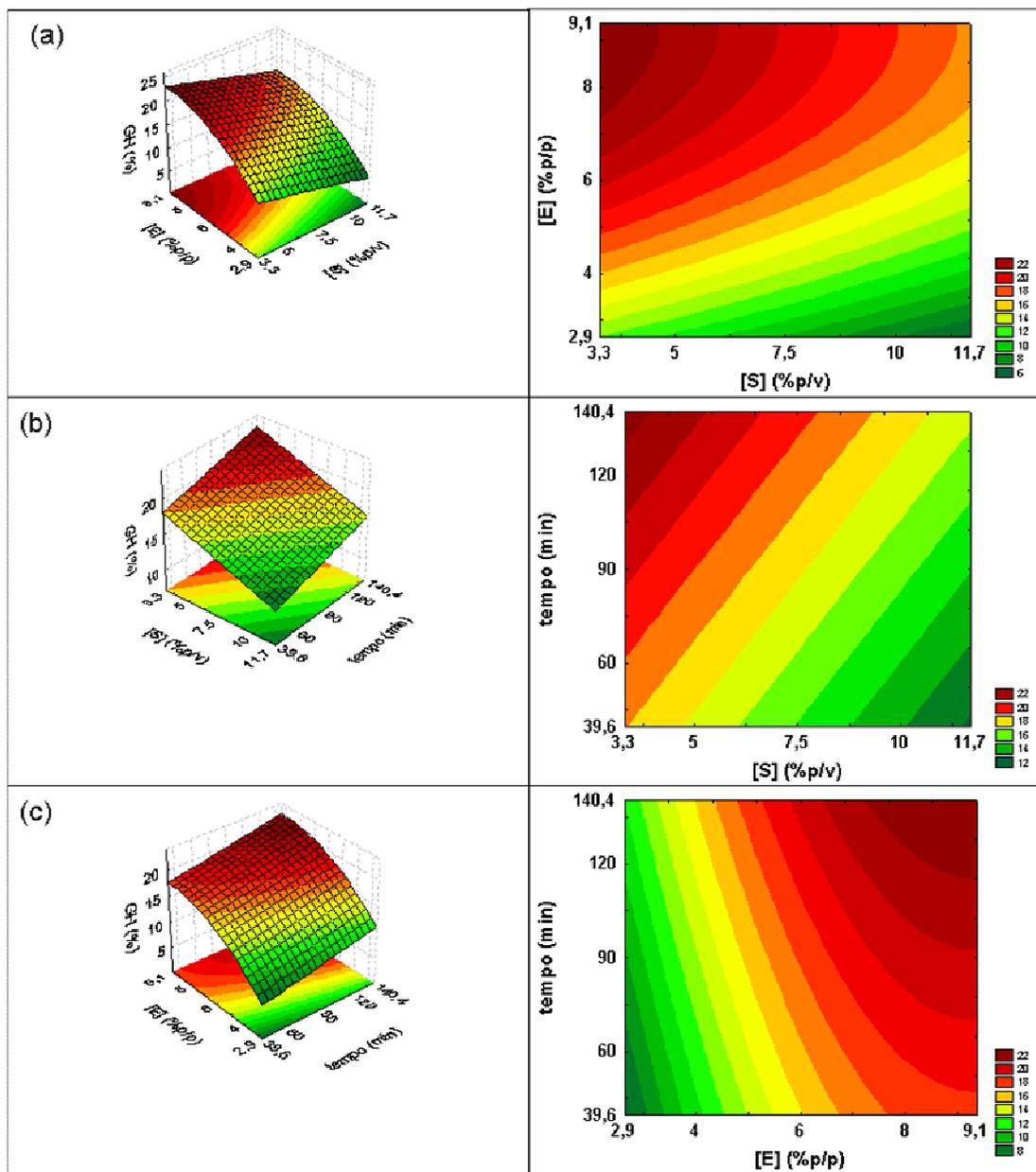


Figura 4.5 – Superfícies de resposta e suas respectivas curvas de contorno do grau de hidrólise (GH) em função da [S] e da [E] (a), da [S] e do tempo (b), [E] e do tempo (c) das proteínas de coxa de frango com a enzima Flavourzyme.

Através da Figura 4.5 podemos constatar que elevados valores de GH são obtidos em: baixas [S], em torno de 3,3%; em [E] entre 8 e 9%; e tempos de hidrólise acima de 120 minutos. NILSANG *et al.* (2004) otimizaram a hidrólise enzimática na obtenção de concentrado solúvel de pescado, utilizando um planejamento fatorial

randomizado com a enzima Flavourzyme e observaram que o tempo também tinha um efeito linear positivo no GH, indicando que o GH aumentava com a prolongação do tempo de hidrólise, sendo esta a variável mais importante, influenciando os valores de GH. Este comportamento foi semelhante a resultados encontrados por outros pesquisadores (IMM e LEE, 1999; SMYTH e FITZGERALD, 1998) citados por eles. O comportamento encontrado em nosso modelo também é semelhante ao descrito por BAEK e CADWALLADER (1995) que otimizaram as condições de processo para a hidrólise enzimática de resíduos de crustáceos, usando superfície de resposta com a enzima Optimase. Estes pesquisadores observaram que a relação E/S apresentava um efeito linear significativo no GH. O GH aumentava com o aumento da relação E/S e também aumentava com o aumento do tempo de reação. Eles utilizaram elevadas concentrações de substrato (entre 15 e 75%), e observaram que o GH aumentava quando a [S] decaía para 45%(p/v).

Estudos comparativos de enzimas exógenas como a Alcalase e a Flavourzyme são complicados devido a que estas enzimas possuem diferenças em atividade específica, em especificidade e em condições ótimas de trabalho. Em alguns casos, como o descrito por ASPMO *et al.* (2005), as enzimas proteolíticas têm sido comparadas através de ajuste das condições de hidrólise às condições ótimas descritas pelos fabricantes, sem considerarem que estas condições ótimas podem depender do substrato utilizado. De acordo com SMYTH e FITZGERALD (1998) a especificidade e o nível de atividade enzimática em preparados de enzimas disponíveis comercialmente não são bem caracterizados. Estes autores avaliaram diferentes preparados enzimáticos utilizando diferentes substratos fluorogênicos sintéticos e observaram que a enzima Flavourzyme apresentava o maior nível de atividade aminopeptidase e também apresentava uma certa atividade endoproteínase; já a enzima Alcalase era a que apresentava a maior atividade endoproteínase. Devido a diferente especificidade e modos de ação das proteases SOARES *et al.* (2000) utilizaram um substrato protéico para detectar o nível de proteólise geral de diferentes enzimas. Utilizando azocaseína em uma concentração de 2% (p/v) a 40°C em pH 7 por 40 minutos observaram que a enzima Alcalase apresentava a maior atividade, enquanto a enzima Flavourzyme apresentava 66,12% de atividade relativa à Alcalase. KRISTINSSON e RASCO (2000^b) utilizaram azacoll, um substrato sintético, para avaliar a atividade proteolítica de diferentes preparados enzimáticos, e também verificaram que a enzima Alcalase apresentava uma atividade superior a enzima Flavourzyme (668.896 U azacoll/g e 59.630 U azacoll/g, respectivamente). Isto vem a

concordar com os resultados obtidos no presente trabalho, onde se observou que maiores valores de GH foram obtidos em peito e coxa de frango com a enzima Alcalase. Embora a enzima Flavourzyme apresente uma menor atividade, SOARES (2006) constatou que a Flavourzyme é uma enzima que precisa de um tempo maior de hidrólise para atingir o GH desejado. HRCKOVÀ *et al.* (2002) também observaram isto quando acompanharam a hidrólise de farinha de soja desengordurada com as enzimas Alcalase, Flavourzyme e Novozyme e verificaram que o maior GH era atingido com a enzima Flavourzyme (39,5%), sendo que o GH com a Flavourzyme ultrapassava o GH com a Alcalase somente em tempo de hidrólise acima de 200 minutos, indicando que esta enzima pode apresentar uma alta estabilidade durante longos períodos de hidrólise. Como estas enzimas apresentam diferente especificidade, portanto irão apresentar diferente perfil de peptídeos após o processo de hidrólise, o que irá influenciar nas propriedades funcionais dos hidrolisados protéicos obtidos.

4.3 Secagem dos Hidrolisados de Carne de Frango

A Tabela 4.13 apresenta as condições de hidrólise enzimática para se obter hidrolisados de baixo e alto grau de hidrólise em peito e coxa de frango com as enzimas Alcalase e Flavourzyme determinados através da análise dos resultados obtidos no planejamento experimental. A partir destas condições, obtiveram-se oito hidrolisados que foram submetidos ao estudo cinético de secagem. Estes hidrolisados apresentaram valores de GH próximos aos valores obtidos no planejamento experimental, sendo que para a enzima Flavourzyme obtiveram-se valores menores em todos os casos, devido a uma maior dificuldade de agitação do meio durante o processo com esta enzima. Esta diferença entre os valores é devido à mudança de escala de produção para obtenção dos hidrolisados, os valores de GH abaixo foram obtidos em uma escala de produção 10 vezes maior em relação aos valores de GH obtidos nos ensaios do planejamento experimental.

Tabela 4.13 - Condições de hidrólise das proteínas de peito e coxa de frango, grau de hidrólise e umidade inicial dos hidrolisados.

Hidrolisado	Substrato - Enzima	[S] (%p/v)	[E] (%p/p)	t (min)	GH (%)*	Umidade inicial (%)*
H1	Peito - Alcalase	11,7	6	90	21,85 ± 0,32 (B)	85,74 ± 0,01
H2	Coxa - Alcalase	10,0	4	60	20,40 ± 1,01 (B)	87,31 ± 0,02
H3	Peito - Alcalase	3,3	6	90	53,25 ± 0,64 (A)	92,01 ± 0,04
H4	Coxa - Alcalase	5,0	8	120	37,64 ± 0,82 (A)	91,51 ± 0,01
H5	Peito - Flavourzyme	10,0	4	60	14,26 ± 0,80 (B)	86,97 ± 0,10
H6	Coxa -Flavourzyme	10,0	4	60	6,34 ± 0,14 (B)	88,24 ± 0,05
H7	Peito - Flavourzyme	3,3	6	90	36,18 ± 1,78 (A)	92,99 ± 0,04
H8	Coxa -Flavourzyme	5,0	8	120	19,85 ± 0,10 (A)	92,16 ± 0,09

[S] = concentração de substrato; [E] = concentração de enzima; t = tempo; GH = grau de hidrólise; B = baixo e A = alto. *Resultado expresso como média e desvio padrão de 3 determinações.

Através da Tabela 4.13 também podemos observar os valores de umidade inicial correspondente a cada hidrolisado onde constatamos que os hidrolisados com maior concentração de substrato apresentaram menores valores de umidade inicial comparados com os hidrolisados de menor concentração de substrato. Os hidrolisados com alto grau de hidrólise apresentaram elevados valores de umidade inicial acima de 90%, enquanto os hidrolisados com baixo GH apresentaram valores de umidade inicial de 85,74 a 88,24%. A umidade inicial é um parâmetro importante em um processo de secagem, segundo CHIRIFE (1983) na secagem de alimentos, o período de taxa constante só tem relativa importância quando o teor de umidade inicial do sólido é muito alto. O que vai de encontro ao material submetido a secagem em nosso trabalho, que apresentaram teores de umidade inicial entre 85,74 e 92,99%. A Figura 4.6 apresenta as curvas de taxa de secagem por unidade de área em função da umidade média e a Figura 4.7 apresenta as curvas do adimensional de umidade em função do tempo. São estas as curvas que descrevem o comportamento da secagem dos hidrolisados de baixo e alto grau de hidrólise obtidos a partir de peito e coxa de frango com as enzimas Alcalase e Flavourzyme.

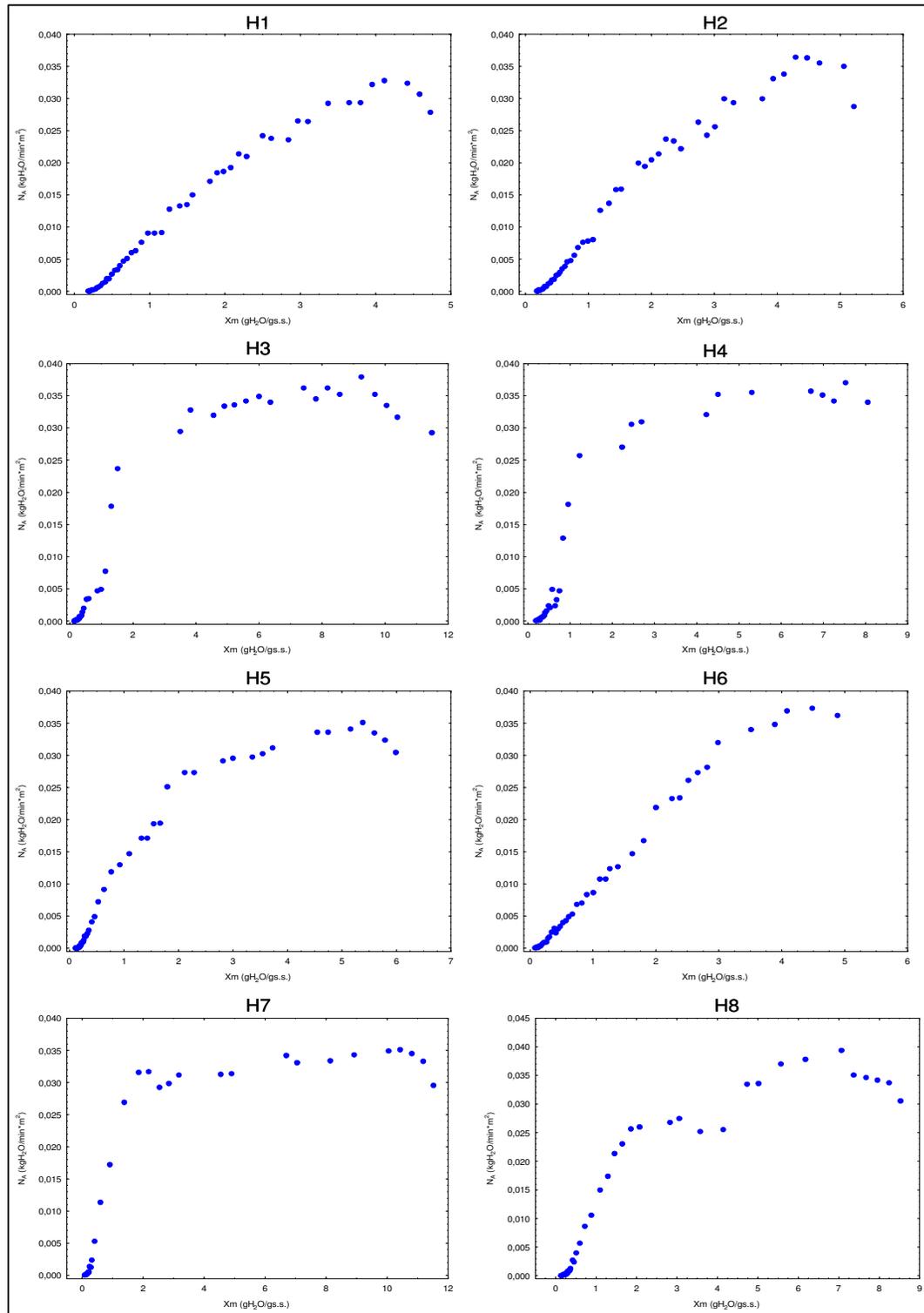


Figura 4.6 – Curvas de taxa de secagem por m² em função da umidade média dos hidrolisados de carne de frango com enzimas proteolíticas.

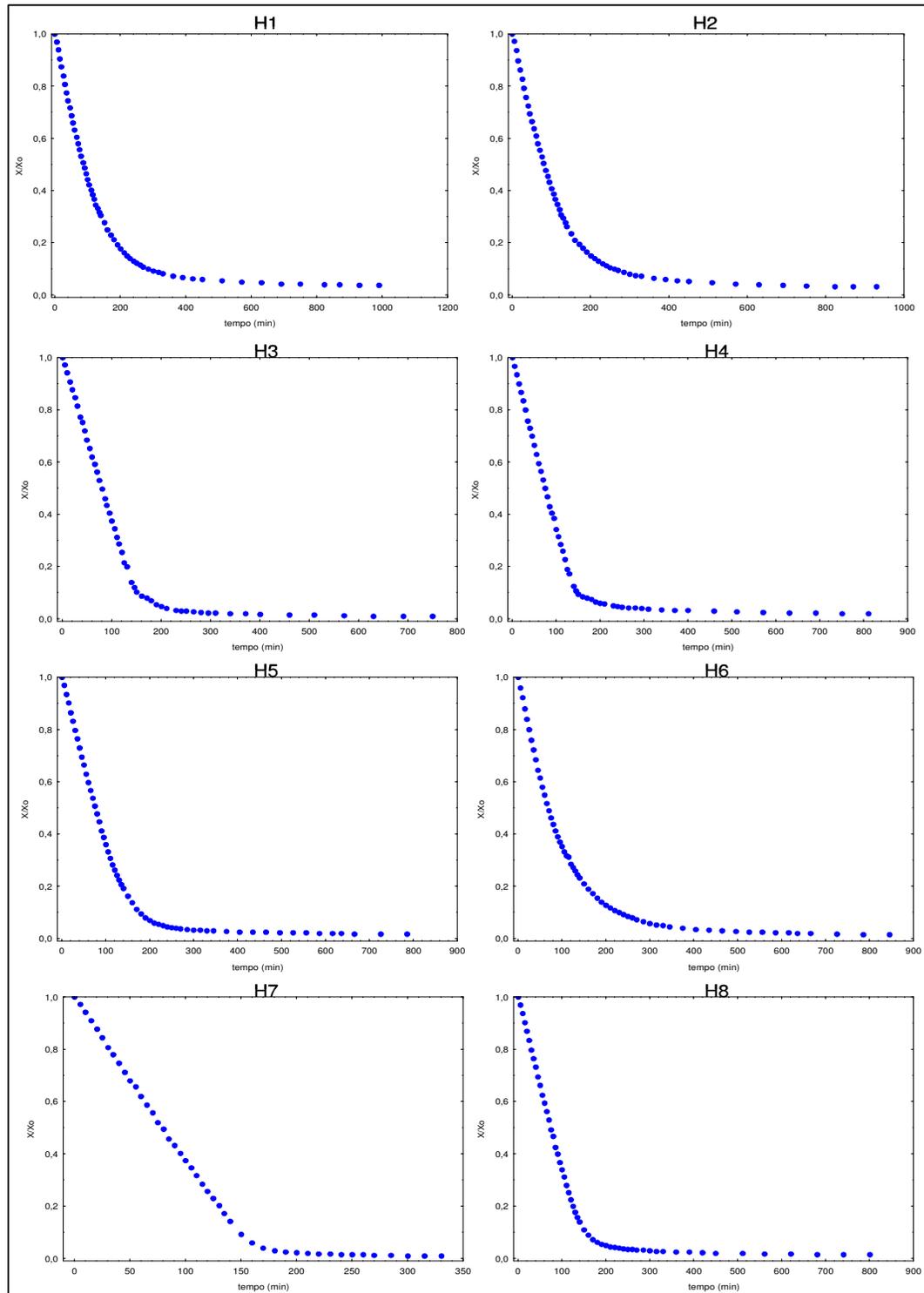


Figura 4.7 – Curvas de dimensional de umidade em função do tempo de secagem dos hidrolisados de carne de frango com enzimas proteolíticas.

De acordo com VILLELA e SILVA (1992) considerando que a temperatura, a umidade relativa, a velocidade e a distribuição do ar sejam uniformes, o processo de secagem pode ser definido em duas etapas diferentes: o período de taxa constante e o período de taxa decrescente. Através das curvas da Figura 4.6 podemos observar claramente este comportamento na secagem dos hidrolisados de carne de frango, onde constatamos que os hidrolisados com maior conteúdo de umidade inicial (H3, H4, H7 e H8) apresentaram maiores períodos de taxa constante que os hidrolisados de menor conteúdo de umidade inicial (H1, H2, H5 e H6), como era esperado. O término do período de taxa constante é alcançado quando a migração interna de água para a superfície não consegue mais suprir a taxa de evaporação da água livre da superfície (GEANKOPLIS, 1993). O valor de umidade crítica (X_c), que cessa o período de taxa constante, apresentou-se próximo a $3 \text{ g}_{\text{H}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{sólido seco}}$ para todos os hidrolisados, exceto para o hidrolisado H7 que apresentou o valor de X_c próximo a $2 \text{ g}_{\text{H}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{sólido seco}}$.

Após o término do período de taxa constante, inicia-se o período de taxa decrescente, que é dividido em primeiro e segundo período, onde o valor de umidade que divide estes dois estágios é denominado umidade de transição (X_t). Este valor de umidade de transição é melhor visualizado através da curva do adimensional de secagem em escala logarítmica em função do tempo (ANEXO B). Os hidrolisados apresentaram valores de umidade de transição entre 0,226 e 0,391 $\text{g}_{\text{H}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{sólido seco}}$.

Através da Figura 4.7 constatou-se que o valor de umidade de equilíbrio (X_e) dos hidrolisados foi obtida após longos períodos de secagem, acima de 800 minutos, exceto o hidrolisado H7, que alcançou a umidade de equilíbrio em torno dos 300 minutos de secagem. Os valores de umidade de equilíbrio (X_e) obtidos para os hidrolisados variaram de 0,072 a 0,177 $\text{g}_{\text{H}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{sólido seco}}$. Era nitidamente visível a formação de um filme na camada superficial dos hidrolisados durante o processo de secagem, sendo que nos hidrolisados obtidos com a enzima Alcalase este filme era mais rígido. O hidrolisado H7 se destacou em relação aos demais hidrolisados durante a etapa de secagem. O menor tempo de secagem apresentado por este hidrolisado, poderia ter sido devido às alterações provocadas pela enzima Flavourzyme na estrutura protéica e também por este hidrolisado apresentar uma menor quantidade de massa protéica. BIANCHI (2006) supôs que a composição das matérias-primas tenha influenciado na variação dos tempos totais de secagem de polpas de corvina (*Micropogonias furnieri*) e cabrina (*Prionotus punctatus*), sendo que o teor de lipídeos poderia ter influenciado na transferência de calor e massa, aumentando o tempo de secagem. Segundo este autor as proteínas solúveis dissolvidas na fase aquosa atuam

como agentes emulsificantes, recobrando todas as partículas de gordura. Esta interação das proteínas com a gordura, provavelmente tenham dificultado o processo de secagem dos hidrolisados de carne de frango.

Outro fenômeno que poderia ter ocorrido durante o processo de secagem dos hidrolisados é a formação de gel. Segundo SGARBIERI (1998) a ação do calor promove a desnaturação da proteína e a conseqüente abertura das cadeias com a exposição de grupos hidrofóbicos que se atraem mutuamente. Concomitantemente podem se formar ligações cruzadas, tipo ligações dissulfeto que promovem a formação de estrutura tridimensional capaz de aprisionar água e produzir a imobilização do sistema.

Para estimativa da constante de secagem, plotaram-se os gráficos apresentados na Figura 4.8. A partir de uma regressão utilizando um modelo de ajuste exponencial puderam-se encontrar os valores de constante de secagem (K) para os hidrolisados de peito e coxa de frango obtidos a partir da hidrólise enzimática com as enzimas Alcalase e Flavourzyme.

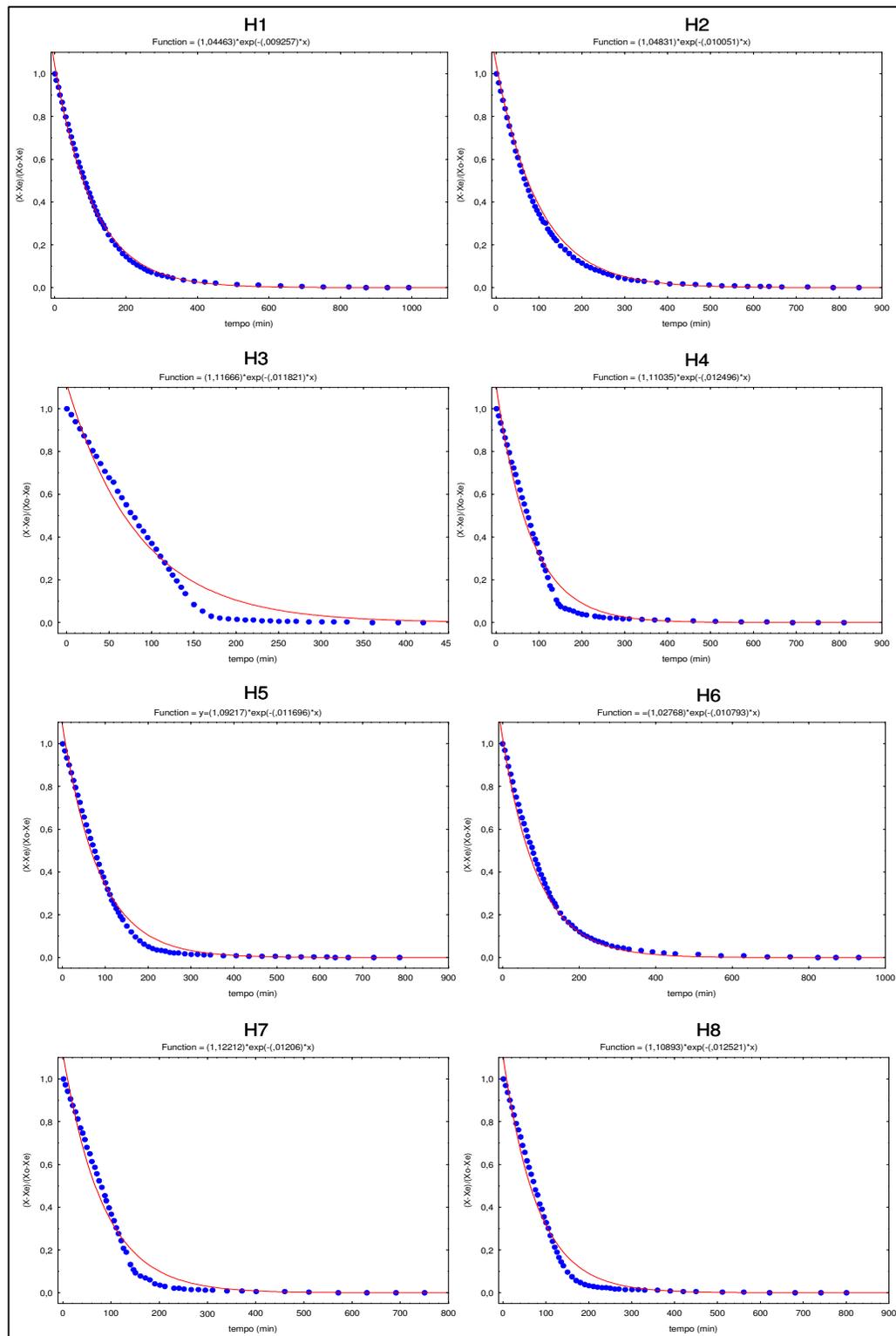


Figura 4.8 – Curvas de adimensional de água livre em função do tempo de secagem dos hidrolisados de carne de frango com enzimas proteolíticas.

A Tabela 4.14 apresenta os valores dos parâmetros de secagem obtidos através da regressão dos dados de adimensional de água livre em função do tempo, utilizando um modelo de ajuste exponencial, bem como os valores de umidade final e tempo de secagem para cada hidrolisado enzimático de carne de frango obtido ao final do processo cinético de secagem.

Tabela 4.14 – Valores de constante de secagem, difusividade efetiva, umidade final e tempo de secagem para os hidrolisados de carne de frango.

Hidrolisado	Substrato - Enzima	GH (%)	K (min ⁻¹)	R	D _{ef} (m ² /s)	Umidade final (%)	Tempo de secagem (min)
H1	Peito - Alcalase	21,85	0,009257	0,9989	1,56x10 ⁻⁰⁹	15,03	990
H2	Coxa - Alcalase	20,40	0,010051	0,9987	1,70x10 ⁻⁰⁹	14,53	940
H3	Peito - Alcalase	53,25	0,011821	0,9875	2,00x10 ⁻⁰⁹	10,43	750
H4	Coxa - Alcalase	37,64	0,012521	0,9885	2,11x10 ⁻⁰⁹	14,21	810
H5	Peito - Flavourzyme	14,26	0,011696	0,9944	1,98x10 ⁻⁰⁹	9,30	785
H6	Coxa - Flavourzyme	6,34	0,010793	0,9997	1,82x10 ⁻⁰⁹	9,82	615
H7	Peito - Flavourzyme	36,18	0,012060	0,9841	2,04x10 ⁻⁰⁹	9,95	330
H8	Coxa - Flavourzyme	19,85	0,012496	0,9907	2,11x10 ⁻⁰⁹	10,94	800

GH = grau de hidrólise; K = constante de secagem; R = coeficiente de correlação e Def = difusividade efetiva.

Através da Tabela 4.14 verificou-se que a correlação exponencial apresentou um bom ajuste para o cálculo da constante de secagem, evidenciado pelos elevados valores de coeficiente de regressão (R). Os valores de constante de secagem (K) obtidos para os hidrolisados encontraram-se entre 0,0092 e 0,0125 min⁻¹, e os valores de difusividade efetiva (D_{ef}) encontraram-se entre 1,56x10⁻⁹ e 2,11x10⁻⁹ m²/s. Não foi possível comparar os valores de K e D_{ef} entre os hidrolisados, devido ao fato de que não se conseguiu manter um mesmo nível de umidade final para todos hidrolisados. Em alguns hidrolisados (H1, H2, H3, H4, e H8) não foi possível reduzir a umidade abaixo de 10%, valor recomendado pela legislação para produtos do tipo “Pós para Preparo de Alimentos” segundo Resolução da Diretoria Colegiada N^o 273, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 22 de setembro de 2005. Como podemos observar através da Figura 4.6, a taxa de secagem torna-se praticamente nula no fim da operação de secagem, sem conseguir-se reduzir o teor de umidade desses hidrolisados até o valor ideal.

Resultados semelhantes foram encontrados por GARCIA (2007) que obteve polpas de base protéica de anchoita (*Engraulis anchoita*) a partir de lavagens com H₂O e H₃PO₄, que apresentaram valores de constante secagem de 0,011 e 0,015 min⁻¹, respectivamente, em condições de secagem semelhantes a este trabalho. BIANCHI (2006) estudou a influência da espessura da camada da polpa de corvina (*Micropogonias furnieri*) e cabrina (*Prionotus punctatus*) e da temperatura no processo de secagem, e obteve valores de difusividade efetiva variando de 0,61 a 8,16x10⁻⁹m²/s. Este autor verificou que a temperatura e a espessura da camada de polpa influenciavam no transporte de água do interior da amostra, e que o mecanismo de difusividade foi o que predominou durante a secagem das polpas de pescado.

Analisando os dados da Tabela 4.14 observa-se que o hidrolisado de peito (H1) e os de coxa de frango (H2 e H4) obtidos com a enzima Alcalase, apresentaram os maiores tempos de secagem e maiores valores de umidade final. Já o hidrolisado de maior grau de hidrólise com a enzima Flavourzyme (H7) apresentou o menor tempo de secagem comparado com os demais hidrolisados, indicando que o GH e o tipo de enzima utilizada influenciam no processo de secagem dos hidrolisados enzimáticos. Obter o menor tempo de secagem é de fundamental importância para processos industriais, pois dessa forma é possível minimizar gastos com energia e menor probabilidade de que aconteçam alterações das proteínas por efeito do calor. Segundo MORAES (2007) hidrolisados protéicos são frequentemente secos por atomização ou liofilização.

Os hidrolisados protéicos de carne de frango secos em secador de bandeja apresentaram valores de umidade final entre 9,30 e 15,03% em seus respectivos tempos de secagem.

4.4 Composição Proximal dos Hidrolisados Secos Integrais

A Tabela 4.15 apresenta a composição proximal dos hidrolisados de peito e coxa de frango de baixo e alto grau de hidrólise, obtidos com as enzimas Alcalase e Flavourzyme a partir dos resultados obtidos nos ensaios do planejamento experimental.

Tabela 4.15 – Composição proximal* (b.u) dos hidrolisados protéicos de carne de frango.

Amostra	S-E	GH (%)	Umidade (%)	Proteína (%)	Gordura (%)	Cinzas (%)
H1	P-A	21,85	14,99 ± 0,45	63,81 ± 0,01	9,08 ± 0,26	13,04 ± 0,05
H2	C-A	20,40	11,28 ± 0,07	54,70 ± 2,36	19,46 ± 1,27	14,74 ± 0,01
H3	P-A	53,25	9,57 ± 0,02	47,32 ± 0,07	14,85 ± 1,53	29,01 ± 0,12
H4	C-A	37,64	11,77 ± 1,75	43,52 ± 0,77	15,16 ± 0,34	29,08 ± 0,11
H5	P-F	14,26	7,69 ± 0,09	65,99 ± 0,39	12,41 ± 0,09	16,72 ± 0,71
H6	C-F	6,34	6,90 ± 0,36	58,83 ± 0,48	17,75 ± 1,21	16,02 ± 0,08
H7	P-F	36,18	8,17 ± 0,30	42,33 ± 1,45	14,64 ± 1,28	34,55 ± 0,13
H8	C-F	19,85	8,08 ± 0,04	48,28 ± 0,35	14,33 ± 0,96	29,13 ± 0,08

S-E: Substrato-Enzima; P-A: Peito-Alcalase; C-A: Coxa-Alcalase; P-F: Peito-Flavourzyme; C-F: Coxa-Flavourzyme; GH = grau de hidrólise. *Resultado expresso como média e desvio padrão de 3 determinações.

Os valores de umidade dos hidrolisados variaram entre 6,90 a 14,99%, devido ao diferente comportamento apresentado pelos hidrolisados durante o processo de secagem, não foi possível manter todos os hidrolisados com um teor de umidade abaixo de 10%, valor recomendado para este tipo de produto segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2005^a). Porém os maiores valores de umidade encontraram-se próximos ao teor de umidade recomendado para produtos em pó, tipo farinha, que permitem uma umidade de 14% (BRASIL, 2005^b). Os valores de umidade apresentados pelos hidrolisados foram todos inferiores aos valores apresentados pelos mesmos hidrolisados nos ensaios cinéticos de secagem (Tabela 4.14), este fato é decorrente de que no estudo cinético, a secagem é interrompida inúmeras vezes, para se fazer as medidas de perda de massa, acarretando em uma maior umidade no final do processo.

Através da tabela 4.15 podemos observar que os hidrolisados obtidos de carne de frango obtiveram teores de proteína entre 42,33 e 65,99%. Valores semelhantes foram encontrados por CENTENARO (2007) que obteve hidrolisados de corvina (*Micropogonias furnieri*) com a enzima Alcalase com teores de proteína entre 42,8 e 74,5%. NILSANG *et al.* (2004) obtiveram hidrolisados de pescado com teor de proteína próximo a 66%, ressaltaram que este teor de proteínas era similar a outros estudos reportados (KRISTINSSON e RASCO, 2000^c; LICEAGA-GESUALDO e LI-CHAN, 1999; BENJAKUL e MORRISSEY, 1997; SHAHIDI *et al.*, 1995) que variavam numa faixa de 62 a 90%.

O elevado conteúdo de lipídeos, entre 9,08 e 19,46%, encontrado neste trabalho foi decorrente da obtenção de um hidrolisado tipo integral, onde não ocorreu uma etapa para remoção dos lipídeos durante o processo. Hidrolisados com maiores teores de gordura foram obtidos a partir da hidrólise de coxa de frango, matéria-prima que contém maior teor de lipídeos do que o peito de frango. GILDBERG (1992) cita algumas patentes norte-americanas que produziam um hidrolisado integral de pescado que continha cerca de 25% de lipídeos. Os hidrolisados obtidos em nosso trabalho também apresentaram elevados teores de cinzas, alcançando valores próximos a 35%, valores estes decorrentes da adição de solução tampão no meio de reação para ajustar o pH durante a hidrólise enzimática. Valores próximos a 35% foram encontrados por CENTENARO (2007). Elevados teores de cinzas também foram encontrados nos hidrolisados obtidos por DUMAY *et al.* (2006), um teor de 25,94% de cinzas em hidrolisados de pescado com a enzima Flavourzyme. Entre outros autores que encontraram elevados teores de cinzas em seus trabalhos estão GBOGOURI *et al.* (2004), NEVES *et al.* (2004), LICEAGA-GESUALDO e LI-CHAN (1999), e SHAHIDI *et al.* (1995).

4.5 Propriedades Funcionais dos Hidrolisados Enzimáticos de Carne de Frango

4.5.1 Propriedades de hidratação

4.5.1.1 Solubilidade

A Tabela 4.16 apresenta os valores de solubilidade dos hidrolisados de baixo e alto grau de hidrólise, obtidos a partir da hidrólise das proteínas de peito e coxa de frango com as enzimas Alcalase e Flavourzyme. Os hidrolisados obtidos pela hidrólise com enzima Alcalase, obtiveram maiores valores de solubilidade que aqueles obtidos pela ação da enzima Flavourzyme, sendo que o grau de hidrólise teve um efeito maior na solubilidade dos hidrolisados feitos com Alcalase, principalmente os que utilizavam a coxa como matéria-prima. Já os hidrolisados obtidos com a enzima Flavourzyme não apresentaram um efeito tão marcante do GH na solubilidade, como se pode verificar nos hidrolisados H6 e H8 com graus de hidrólise bem diferentes e valores de solubilidade semelhantes.

Tabela 4.16 – Valores de solubilidade obtidos para os hidrolisados protéicos de carne de frango e para os músculos *in natura* em diferentes valores de pH.

Amostras	Substrato - Enzima	GH (%)	Solubilidade (%)*				
			pH 3	pH 5	pH 7	pH 9	pH 11
H1	Peito - Alcalase	21,85	33,03 ^{eB}	32,18 ^{dB}	32,98 ^{deB}	32,78 ^{dB}	36,70 ^{dA}
H2	Coxa - Alcalase	20,40	55,10 ^{bA}	54,85 ^{bA}	55,68 ^{bA}	55,36 ^{bA}	46,94 ^{cB}
H3	Peito - Alcalase	53,25	50,02 ^{cB}	49,64 ^{cB}	50,65 ^{cAB}	52,82 ^{bA}	51,78 ^{bAB}
H4	Coxa - Alcalase	37,64	77,30 ^{aA}	79,18 ^{aA}	76,74 ^{aA}	76,57 ^{aA}	74,66 ^{aA}
H5	Peito - Flavourzyme	14,26	21,01 ^{hB}	21,34 ^{gB}	21,47 ^{hB}	21,72 ^{eB}	24,56 ^{fA}
H6	Coxa -Flavourzyme	6,34	22,67 ^{gB}	24,27 ^{fA}	25,73 ^{fgA}	25,56 ^{eA}	25,76 ^{fA}
H7	Peito - Flavourzyme	36,18	23,34 ^{gD}	22,57 ^{fgE}	23,88 ^{ghC}	25,25 ^{eB}	25,83 ^{fA}
H8	Coxa -Flavourzyme	19,85	27,79 ^{fb}	28,21 ^{eB}	30,15 ^{eA}	30,65 ^{dA}	31,05 ^{eA}
Peito <i>in.</i>	-	-	35,60 ^{dB}	26,70 ^{eC}	33,96 ^{dB}	37,74 ^{cB}	45,26 ^{cA}
Coxa <i>in.</i>	-	-	12,08 ^{iD}	26,79 ^{eC}	30,87 ^{deB}	37,50 ^{cA}	38,38 ^{dA}

Letras minúsculas diferentes na vertical indicam haver diferença significativa ($p < 0,05$) de solubilidade entre as amostras no mesmo valor de pH. Letras maiúsculas diferentes na horizontal indicam haver diferença significativa ($p < 0,05$) de solubilidade entre os valores de pH. GH = grau de hidrólise. * Valor médio de três determinações da mesma amostra.

SANTOS (2006) também obteve maiores valores de solubilidade com a enzima Alcalase sobre carne de cabrinha (*Prionotos punctatus*) do que com a enzima Flavourzyme. Em um hidrolisado com GH de 34,70% obtido com a enzima Alcalase este autor obteve valores de solubilidade que variaram de 39,4 a 42,1% e o hidrolisado obtido com a enzima Flavourzyme com GH de 30% apresentou valores de solubilidade variando de 34,2 a 38,7% na mesma faixa de pH estudado nesse trabalho. CLEMENTE *et al.* (1999) também obtiveram maiores valores de solubilidade em uma ampla faixa de pH com a enzima Alcalase em relação à Flavourzyme a partir de hidrolisados de grão-de-bico (*Cicer arietinum*).

Pode-se observar que o hidrolisado protéico com maior solubilidade foi o hidrolisado de maior GH obtido de coxa de frango com a enzima Alcalase (H4), não apresentando diferença significativa de solubilidade em toda a faixa de pH estudada. Os hidrolisados H1, H2 e H5 não apresentaram diferença significativa de solubilidade na faixa de pH entre 3 a 9. O hidrolisado H3 apresentou uma diferença significativa de solubilidade somente no pH 9. O hidrolisado H6 não apresentou diferença de solubilidade nas faixas de pH de 5 a 11. Já o hidrolisado H7 e o músculo de peito de frango apresentaram uma redução significativa de solubilidade em torno do pH 5, valor próximo ao ponto isoelétrico das proteínas de carne de frango, que se encontra entre

valores de pH de 5,0 - 5,1 (HUALLANCO, 2004). O hidrolisado H8 e as proteínas da coxa apresentaram maiores valores de solubilidade em meio alcalino. A Figura 4.9 apresenta graficamente o comportamento da solubilidade dos hidrolisados e das matérias-primas *in natura* (peito e coxa de frango).

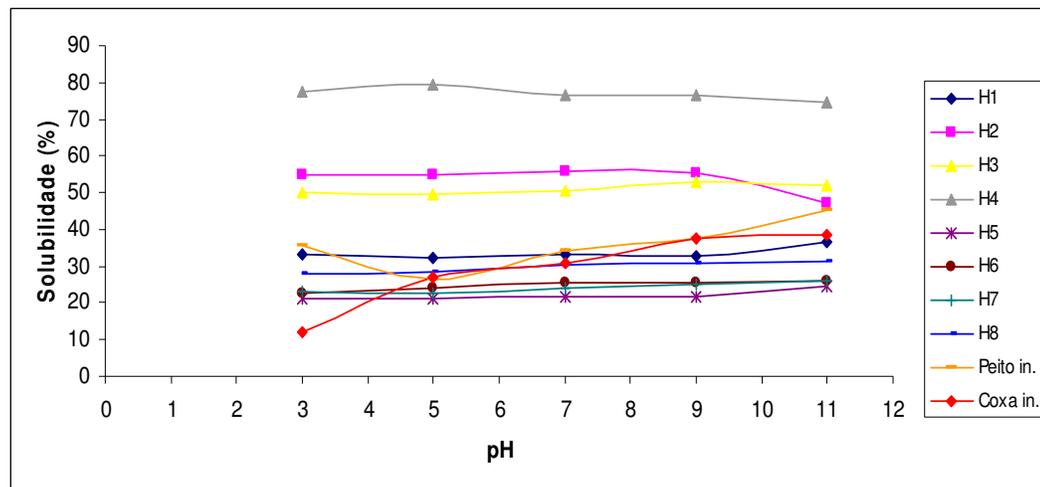


Figura 4.9 – Solubilidades dos hidrolisados e de peito e coxa de frango *in natura* em diferentes valores de pH. Onde: H1 = hidrolisado de baixo GH obtido a partir de peito com Alcalase; H2 = hidrolisado de baixo GH obtido a partir de coxa com Alcalase; H3 = hidrolisado de alto GH obtido a partir de peito com Alcalase; H4 = hidrolisado de alto GH obtido a partir de coxa com Alcalase; H5 = hidrolisado de baixo GH obtido a partir de peito com Flavourzyme; H6 = hidrolisado de baixo GH obtido a partir de coxa com Flavourzyme; H7 = hidrolisado de alto GH obtido a partir de peito com Flavourzyme e H8 = hidrolisado de alto GH obtido a partir de coxa com Flavourzyme.

Em geral, pode-se observar que os hidrolisados obtidos a partir de coxa apresentaram valores maiores de solubilidade do que os hidrolisados obtidos de peito de frango. No entanto, o músculo *in natura* de peito de frango apresentou valores significativamente maiores em relação à coxa em valores extremos de pH (3 e 11). Porém é importante ressaltar que todos os hidrolisados de coxa de frango, mesmo possuindo menores valores de grau de hidrólise em relação aos hidrolisados de peito, apresentaram maiores valores de solubilidade, indicando que a matéria-prima utilizada apresenta influência na solubilidade do produto final obtido. CENTENARO (2007) obteve valores de solubilidade para hidrolisados de corvina (*Micropogonias furnieri*) com a enzima Alcalase entre 20,26 e 51,90% na mesma faixa de pH estudado neste trabalho. Este autor verificou um pequeno aumento desta propriedade no valor de pH ácido e um aumento progressivo do pH neutro para os pHs alcalinos, sendo que os

maiores valores foram obtidos no pH 11. Em nosso trabalho somente os hidrolisados H1, H5 e o músculo de peito apresentaram valores significativamente maiores no pH 11. De acordo com KRISHNAMURTHY *et al.* (1996) a interação das proteínas musculares com a água é um importante fator nas propriedades funcionais de produtos de carne. Estes autores relataram diferenças na solubilização das proteínas de músculo de peito de frango e músculo de bacalhau, e relataram que as proteínas de músculo de frango eram geralmente menos solúveis do que as proteínas de músculo branco de pescado.

Com relação ao grau de hidrólise, analisando separadamente cada matéria-prima, os hidrolisados obtidos com a enzima Alcalase e Flavourzyme de maior GH apresentaram maiores valores de solubilidade, sendo que os hidrolisados de peito com a enzima Flavourzyme em alguns pHs (5, 7, 9 e 11) não apresentaram diferença significativa entre os valores de baixo e alto GH. SHAHIDI *et al.* (1995) observaram que os concentrados de pescado hidrolisados com diferentes enzimas apresentavam diferente perfil de solubilidade em diferentes condições de pH. Esta diferença foi explicada pela diferente especificidade das enzimas utilizadas no processo. Segundo MAHMOUD (1994) uma hidrólise parcial ou limitada produz um substancial aumento na solubilidade dos hidrolisados, particularmente no ponto isoelétrico da proteína nativa. FURLAN (2002) também verificou isto, e ressaltou que, hidrolisados de pescado mostravam excelente dispersibilidade em água e alta solubilidade sob um largo intervalo de pH, principalmente no ponto isoelétrico da proteína. Como se observa na Figura 4.9 as curvas de solubilidade dos hidrolisados se mostraram relativamente constantes, verificando-se também que no ponto isoelétrico das proteínas dos hidrolisados houve um aumento da solubilidade.

ROMAN e SGARBIERI (2005) em um estudo sobre as propriedades funcionais de caseína bovina hidrolisada com a enzima Flavourzyme, obtiveram maior valor de solubilidade com o hidrolisado de maior GH, ressaltando que o GH altera de forma significativa as propriedades interfásicas dos hidrolisados. Segundo CLEMENTE *et al.* (1999) e ROMAN e SGARBIERI (2005) o aumento da solubilidade dos hidrolisados é, provavelmente, devido a diminuição do tamanho das moléculas e correspondente aumento da exposição de grupos hidrofílicos amino e carboxil ionizáveis. DINIZ e MARTIN (1997) sugeriram que o aumento na solubilidade da proteína hidrolisada em relação a proteína original é devido à redução de sua estrutura secundária e a liberação enzimática de pequenas unidades polipeptídicas da proteína. CÂNDIDO e SGARBIERI (2003) observaram uma correlação linear positiva, entre solubilidade e o

GH de hidrolisados de tilápia do Nilo, com a enzima Flavourzyme na faixa de 2,5 a 25% de GH. Eles também justificaram que esta correlação entre solubilidade e GH era devido ao decréscimo no tamanho dos peptídeos e ao maior número de peptídeos solúveis, que eram produzidos em valores altos de grau de hidrólise.

Segundo CLAVER e ZHOU (2005) a hidrólise enzimática com proteases apresentava-se como uma maneira satisfatória de melhorar o rendimento em proteínas solúveis de farinha de gérmen desengordurada. O tratamento com Alcalase e Flavourzyme solubilizava 85 e 80% do total de proteínas, respectivamente. Essas duas enzimas apresentaram a maior solubilização entre as cinco proteases (Flavourzyme, Papaína, Neutrase, Protamex e Alcalase) estudadas por estes autores. GBOGOURI *et al.* (2004) obtiveram excelentes valores de solubilidade, em uma ampla faixa de pH, para hidrolisados de cabeças de salmão com a enzima Alcalase.

Os hidrolisados protéicos obtidos nesse trabalho poderiam encontrar aplicação em produtos como sopas desidratadas, comida hipoalergênica para bebês, alimentação animal, e enriquecimento protéico de produtos líquidos que não precisem de uma solubilidade extremamente elevada. Segundo FURLAN (2002) hidrolisados protéicos podem apresentar excelente solubilidade, e também apresentar boa capacidade de emulsificação, e de formação de espuma.

4.5.1.2 Capacidade de retenção de água (CRA)

Através da Tabela 4.17 podemos observar os valores de capacidade de retenção de água para os hidrolisados de baixo e alto grau de hidrólise obtidos a partir da hidrólise das proteínas de peito e coxa de frango com as enzimas Alcalase e Flavourzyme. Constatamos que os hidrolisados obtidos com a enzima Alcalase, apresentaram reduzida capacidade de retenção de água, o que corresponde ao trabalho de FONKWE e SINGH (1996) que hidrolisaram resíduos de carne de peru mecanicamente separada com papaína, que também é uma endoproteinase, obtendo um produto que não apresentava valores de CRA superior a 0,5 mL água/g proteína. Por outro lado, valores maiores de CRA foram obtidos para os hidrolisados tratados com a enzima Flavourzyme, quando comparados aos valores obtidos com a enzima Alcalase; o mesmo efeito foi constatado por SANTOS (2006) que relatou que a alta solubilidade levava a uma diminuição na CRA da proteína de pescado. Esta relação inversa entre CRA e solubilidade também foi verificada neste trabalho. Os hidrolisados obtidos com Alcalase, com valores de solubilidade na faixa de 32 a 79%, apresentaram valores de CRA inferiores a 1 grama de água por grama de proteína, no

entanto os hidrolisados obtidos com Flavourzyme com valores de solubilidade na faixa de 21 a 31% apresentaram valores de CRA na faixa de 2 a 4,5 g água/g proteína.

Tabela 4.17 – Valores de capacidade de retenção de água (CRA) obtidos para os hidrolisados protéicos de carne de frango e para os músculos in natura em diferentes valores de pH.

Amostras	Substrato - Enzima	GH (%)	CRA (g água/g proteína)*				
			pH 3	pH 5	pH 7	pH 9	pH 11
H1	Peito - Alcalase	21,85	0,60 ^{cdA}	0,85 ^{ca}	0,93 ^{cdA}	0,72 ^{da}	0,22 ^{dB}
H2	Coxa - Alcalase	20,40	0,04 ^{cdA}	<0,01 ^{dB}	<0,01 ^{dB}	<0,01 ^{eb}	<0,01 ^{dB}
H3	Peito - Alcalase	53,25	<0,01 ^{da}	<0,01 ^{da}	<0,01 ^{da}	<0,01 ^{ea}	<0,01 ^{da}
H4	Coxa - Alcalase	37,64	<0,01 ^{da}	<0,01 ^{da}	<0,01 ^{da}	<0,01 ^{ea}	<0,01 ^{da}
H5	Peito - Flavourzyme	14,26	3,77 ^{aA}	3,66 ^{abA}	3,85 ^{abA}	3,81 ^{ba}	3,91 ^{aA}
H6	Coxa - Flavourzyme	6,34	3,80 ^{aB}	3,96 ^{aAB}	4,48 ^{aA}	3,75 ^{bB}	4,06 ^{aAB}
H7	Peito - Flavourzyme	36,18	3,49 ^{aBC}	3,19 ^{bBC}	4,45 ^{aA}	3,81 ^{bB}	3,15 ^{bC}
H8	Coxa - Flavourzyme	19,85	2,66 ^{bAB}	2,84 ^{ba}	2,67 ^{bAB}	2,27 ^{cb}	2,43 ^{cAB}
Peito in.	-	-	3,64 ^{aA}	<0,01 ^{dC}	1,26 ^{cb}	4,14 ^{ba}	<0,01 ^{dC}
Coxa in.	-	-	<0,01 ^{dC}	<0,01 ^{dC}	3,23 ^{bB}	9,12 ^{aA}	<0,01 ^{dC}

Letras minúsculas diferentes na vertical indicam haver diferença significativa ($p < 0,05$) de CRA entre as amostras. Letras maiúsculas diferentes na horizontal indicam haver diferença significativa ($p < 0,05$) de CRA entre os valores de pH. GH = grau de hidrólise. * Valor médio de três determinações da mesma amostra.

Observou-se uma relação inversa do grau de hidrólise dos hidrolisados com a capacidade de retenção de água. Considerando os hidrolisados obtidos com Alcalase sobre peito, verificou-se uma diminuição da CRA com o aumento do GH (hidrolisados H1 e H3). Quando se utilizou coxa de frango constataram-se valores baixos de CRA para os hidrolisados com baixo GH (H2) e com alto GH (H4). Contrariamente, nos hidrolisados obtidos com a enzima Flavourzyme em coxa de frango, constatou-se uma redução maior dos valores de CRA (hidrolisados H6 e H8) com o aumento do GH de 6,34 para 19,85% quando comparados com a menor redução dos valores de CRA (hidrolisados H5 e H7) com o aumento do GH de 14,26 para 36,18% em peito de frango. ROMAN e SGARBIERI (2005) relataram em seu estudo sobre as propriedades funcionais de caseína bovina hidrolisada pela enzima Flavourzyme, que a capacidade de retenção de água diminui com o aumento do grau de hidrólise. Os hidrolisados com GH de 12,8, 20,1 e 35,8% tiveram valores de CRA significativamente inferiores comparados ao hidrolisado com 5,7% e com a caseína (sem hidrólise). KINSELLA (1984), citado por este mesmo autor, relatou que a quantidade de água associada a

proteína depende de uma série de fatores, destacando a sua composição, conformação, número de grupos polares expostos, presença de sais, pH, etc, mas particularmente do tamanho molecular e da capacidade de formação de rede protéica. Os hidrolisados de maior grau de hidrólise (menor peso molecular) não podem formar rede, além de apresentar maior concentração de grupos hidrofóbicos, portanto menor CRA. A Figura 4.10 apresenta graficamente o comportamento da CRA dos hidrolisados e de peito e coxa de frango *in natura* em diferentes valores de pH.

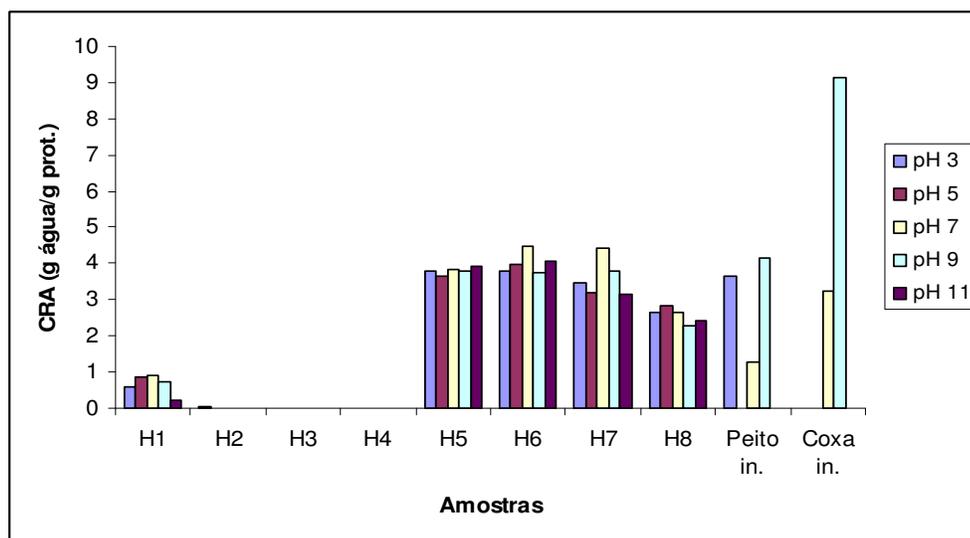


Figura 4.10 - Capacidade de retenção de água dos hidrolisados e de peito e coxa de frango *in natura* em função do pH do meio. Onde: H1 = hidrolisado de baixo GH obtido a partir de peito com Alcalase; H2 = hidrolisado de baixo GH obtido a partir de coxa com Alcalase; H3 = hidrolisado de alto GH obtido a partir de peito com Alcalase; H4 = hidrolisado de alto GH obtido a partir de coxa com Alcalase; H5 = hidrolisado de baixo GH obtido a partir de peito com Flavourzyme; H6 = hidrolisado de baixo GH obtido a partir de coxa com Flavourzyme; H7 = hidrolisado de alto GH obtido a partir de peito com Flavourzyme e H8 = hidrolisado de alto GH obtido a partir de coxa com Flavourzyme.

Observando a Figura 4.10 constatou-se que o pH teve pouca influência sobre os valores de CRA dos hidrolisados obtidos com a Flavourzyme, e menos ainda sobre os hidrolisados obtidos com a Alcalase onde esta propriedade praticamente não se manifestou. Os hidrolisados obtidos com a enzima Flavourzyme, com valores de CRA na faixa de 2,27 a 4,48 g água/g proteína, apresentaram comportamentos diferentes em função do pH do meio, verificando-se em alguns casos (H5 e H7) uma pequena diminuição no valor de pH 5 e pequenos aumentos em pH 7. O comportamento da matéria-prima *in natura* apresentou-se muito diferente dos hidrolisados, apresentando

valores de CRA insignificantes em pH 5, aumentos no pH 7 e um grande aumento no pH 9 para diminuir drasticamente no valor de pH 11. Segundo CÂNDIDO e SGARBIERI (2003) a CRA refere-se a habilidade da proteína para absorver e reter água frente uma força gravitacional. Estes autores ressaltaram que proteínas de pescado não eram frequentemente usadas como agente retentor de água, e que o tratamento enzimático melhorava ligeiramente a CRA na faixa de pH de 4 a 8, sendo que um mínimo de CRA era observado em pH 4 que coincidia com o pH de mínima solubilidade da proteína concentrada. Eles obtiveram valores de CRA entre 3,5 e 4,5 g água/g proteína para os hidrolisados obtidos de tilápia do Nilo com a enzima Flavourzyme com diferentes GH (2,5 a 14,5%).

CENTENARO (2007) obteve valores de CRA para hidrolisados de corvina (*Micropogonias furnieri*) com a enzima Alcalase entre 3,1 e 7 g água/g proteína, além de relatar que o músculo *in natura* deste pescado apresentou menores valores de CRA comparado com os hidrolisados, em toda a faixa de pH estudada, justificando que as proteínas nativas possuem menor capacidade de absorver água que as proteínas desnaturadas devido a alta hidrofobicidade da superfície da proteína desnaturada dos hidrolisados que promoveu a formação de uma matriz protéica capaz de reter determinada quantidade de água em sua estrutura. Em contrapartida, DINIZ e MARTIN (1997) verificaram que o controle (que representava a proteína original do substrato) apresentava valores significativamente maiores de CRA do que os hidrolisados de carne de tubarão com a enzima Alcalase, presumidamente devido à hidrofobicidade polar das cadeias laterais da proteína original. De acordo com CLAVER e ZHOU (2005) o pH afeta a magnitude da rede de moléculas de proteínas, que como consequência, sofre interações de atração e repulsão.

Em nosso estudo as proteínas nativas apresentaram valores maiores de CRA em relação aos hidrolisados somente em pH 9, indicando que a hidrólise enzimática com a enzima Flavourzyme melhorou esta propriedade nos diferentes valores de pH, principalmente quando se compara com baixos valores de CRA no pH 5 (próximo ao ponto isoelétrico das proteínas da carne de frango). Segundo KRISTINSSON e RASCO, (2000^o) hidrolisados com boa capacidade de retenção de água, encontram aplicação em várias formulações de sistemas cárnicos com o objetivo de aumentar o rendimento de produtos cozidos.

4.5.2 Propriedades de superfície

4.5.2.1 Capacidade emulsificante (CE)

A Tabela 4.18 apresenta os valores de capacidade emulsificante para os hidrolisados de baixo e alto grau de hidrólise obtidos a partir da hidrólise das proteínas de peito e coxa de frango com as enzimas Alcalase e Flavourzyme. Através desta tabela podemos observar que o maior valor de capacidade emulsificante obtido entre os hidrolisados, foi de 9 mL de óleo emulsificado por grama de proteína, apresentado pelo hidrolisado H5. Maiores valores de CE foram obtidos com a enzima Flavourzyme, mas somente o hidrolisado H5 apresentou uma diferença significativa em relação aos hidrolisados obtidos com a enzima Alcalase.

Tabela 4.18 – Valores de capacidades emulsificante obtidos para os hidrolisados protéicos de carne de frango e para os músculos in natura de peito e coxa de frango.

Amostras	Substrato - Enzima	GH (%)	CE (mL óleo/ g prot)*
H1	Peito - Alcalase	21,85	4,67 ^d
H2	Coxa - Alcalase	20,40	3,50 ^{de}
H3	Peito - Alcalase	53,25	5,00 ^{cd}
H4	Coxa - Alcalase	37,64	2,00 ^e
H5	Peito - Flavourzyme	14,26	9,00 ^b
H6	Coxa - Flavourzyme	6,34	6,50 ^c
H7	Peito - Flavourzyme	36,18	5,00 ^{cd}
H8	Coxa - Flavourzyme	19,85	6,50 ^c
Peito in.	-	-	28,33 ^a
Coxa in.	-	-	29,50 ^a

Letras minúsculas diferentes na vertical indicam haver diferença significativa ($p < 0,05$) de CE entre as amostras. GH = grau de hidrólise. * Valor médio de três determinações da mesma amostra.

Estes maiores valores obtidos pela enzima Flavourzyme pode ser explicado pela sua diferente especificidade em relação a Alcalase. Segundo SOARES (2006) o grau de hidrólise e a especificidade da enzima são fatores que influenciam muito nas propriedades emulsificantes. Dos hidrolisados produzidos por ROMAN e SGARBIERI (2005) apenas o de menor grau de hidrólise (5,7%) apresentou propriedades emulsificantes, comparados com hidrolisados de maior grau de hidrólise (12,8 e 20,1%). Estes autores ressaltaram que a hidrólise parcial das proteínas geralmente aumenta o número de grupos polares e hidrofílicos, diminuindo o peso molecular, o

que altera a estrutura globular das proteínas, podendo expor maior número de grupos hidrofóbicos; eles informaram ainda que uma hidrólise extensiva das proteínas resultava em uma drástica perda das propriedades funcionais de superfície.

Conforme foi observado nesse trabalho, a enzima Flavourzyme apresentou maiores valores de capacidade emulsificante. SMYTH e FITZGERALD (1998) observaram diferentes características nos hidrolisados obtidos a partir de proteína de soro com diferentes enzimas proteolíticas, onde os hidrolisados obtidos com a enzima Alcalase apresentavam apenas 36,84% dos peptídeos com massa molecular maior que 10kDA após 30 minutos de hidrólise, enquanto a enzima Flavourzyme apresentava 60,14% dos peptídeos com massa molecular maior que 10kDA após 30 minutos de hidrólise. Porém, estes autores ressaltaram que uma hidrólise extensiva com a enzima Flavourzyme, devido a sua atividade exopeptidase resultaria em níveis altos de aminoácidos livres e em peptídeos com menores níveis de hidrofobicidade em relação à Alcalase.

Considerando o corte de carne de frango observou-se que para os hidrolisados com Alcalase a coxa teve uma influência maior na redução da capacidade emulsificante de 3,50 para 2,00 mL óleo/ g proteína com o aumento do GH de 20,40 para 37,64% do que o peito que não apresentou redução com o aumento do de GH, sendo que em ambos os casos não houve uma diferença significativa. Contrariamente, para os hidrolisados obtidos com a enzima Flavourzyme, o peito foi o corte que apresentou um efeito maior na redução da CE com o aumento do GH, sendo que o valor obtido pelo hidrolisado H5 foi o maior desta propriedade comparado com todos os outros hidrolisados. SURÓWKA e FIK (1992) estudaram a recuperação de proteínas de cabeças de frango com a enzima Neutrase, e observaram que as proteínas musculares apresentavam melhores propriedades emulsificantes que as proteínas do tecido conectivo. Nosso estudo concorda com este trabalho, já que em geral, obtiveram-se maiores valores de CE com peito de frango, que é o corte que possui menor quantidade de tecido conectivo comparado com a coxa.

Todos os hidrolisados protéicos apresentaram valores significativamente menores em relação à matéria-prima *in natura* que emulsificou praticamente todo o óleo adicionado (Figura 4.11). Comportamento semelhante foi encontrado por CENTENARO (2007) que também obteve uma maior CE para o músculo de corvina *in natura* (*Micropogonias furnieri*) 18,79 mL óleo/ g prot, enquanto os hidrolisados obtidos com a enzima Alcalase apresentaram valores entre 6 e 12,95 mL óleo/ g prot. Já GOVINDARAJU e SRINIVAS (2006) hidrolisaram uma fração protéica de farinha

desengordurada de amendoim com diferentes enzimas proteolíticas, e todos os hidrolisados apresentaram valores de capacidade emulsificante maiores que o controle em valores de grau de hidrólise entre 3 e 5%, no entanto, com uma hidrólise extensiva, eles verificaram que a capacidade emulsificante dos hidrolisados reduzia significativamente em relação ao músculo sem hidrólise. ADLER-NISSEN e OLSEN (1979), citados por MAHMOUD (1994), também observaram um aumento significativo na capacidade emulsificante de proteína de soja hidrolisada por uma protease fúngica um valor de GH de 5%, mas com a prolongação da hidrólise a capacidade emulsificante decaía substancialmente.

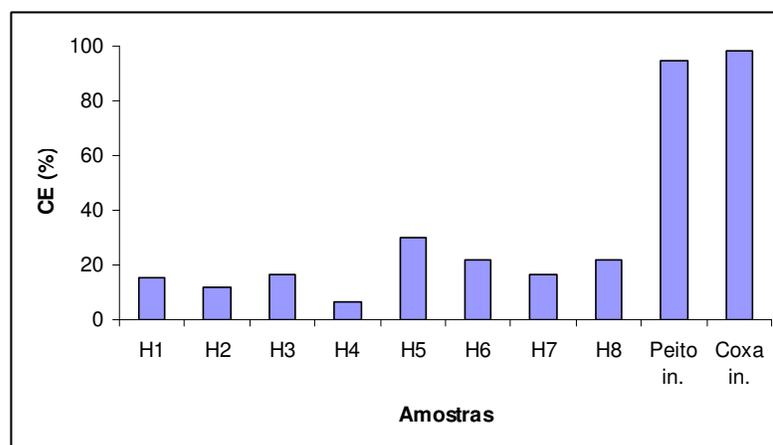


Figura 4.11 – Capacidade emulsificante (%) apresentada pelos hidrolisados e pelo peito e coxa de frango *in natura*. Onde: H1 = hidrolisado de baixo GH obtido a partir de peito com Alcalase; H2 = hidrolisado de baixo GH obtido a partir de coxa com Alcalase; H3 = hidrolisado de alto GH obtido a partir de peito com Alcalase; H4 = hidrolisado de alto GH obtido a partir de coxa com Alcalase; H5 = hidrolisado de baixo GH obtido a partir de peito com Flavourzyme; H6 = hidrolisado de baixo GH obtido a partir de coxa com Flavourzyme; H7 = hidrolisado de alto GH obtido a partir de peito com Flavourzyme e H8 = hidrolisado de alto GH obtido a partir de coxa com Flavourzyme.

Observando a Tabela 4.18 constatou-se que com o aumento do grau de hidrólise dos hidrolisados houve uma diminuição de capacidade emulsificante dos hidrolisados em alguns casos, mas somente o hidrolisado H5 (de baixo GH) apresentou uma redução significativa de capacidade emulsificante em relação ao H7 (de alto GH). Este efeito pode ser explicado através do trabalho de MAHMOUD *et al.* (1992), onde estes autores relataram que a hidrofobicidade parecia ser o principal fator que influenciava as propriedades emulsificantes de hidrolisados de caseína com a enzima pancreatina, sendo que o efeito global da hidrólise enzimática apresentava uma diminuição na hidrofobicidade com o aumento do GH, porém inicialmente a

caseína com 24% de GH resultava em uma redução relativamente pequena na hidrofobicidade. MAHMOUD (1994) relatou que os peptídeos devem apresentar um tamanho mínimo de 20 resíduos em sua cadeia, para possuírem uma boa capacidade emulsificante. Embora pequenos peptídeos difundam-se rapidamente e adsorvam-se na interface, eles são menos eficientes em reduzir a tensão interfacial porque eles não podem desdobrar-se e reorientar-se na interface como as proteínas. Este autor ainda ressalta que diferentes proteases irão liberar diferentes peptídeos, devido a sua especificidade, produzindo diferentes valores de capacidade emulsificante.

LICEAGA-GESUALDO e LI-CHAN (1999) reportaram que a habilidade de uma proteína interagir com óleo ou com outra molécula de proteína, para formar uma camada interfacial, depende de sua flexibilidade e acessibilidade da superfície dos grupos expostos para interação, sendo isto relacionado em particular com interações hidrofóbicas. Através de uma hidrólise enzimática, muitos grupos hidrofóbicos das proteínas poderiam ser expostos para a superfície na forma de peptídeos. De acordo com KIM *et al.* (1990), citados por ELIZALDE *et al.* (1996), o tratamento com enzimas proteolíticas aumentava a capacidade de emulsificação de proteínas de isolado de soja, dependendo da enzima utilizada e da duração do tratamento. QI *et al.* (1997) reportaram que, o aumento da hidrofobicidade após a hidrólise das proteínas de isolado de soja com pancreatina, poderia ser a razão principal para o aumento da absorção de proteína e conteúdo de óleo, devido ao aumento da interação entre os grupos hidrofóbicos e o óleo, resultando em melhores propriedades emulsificantes. Estes autores verificaram que se obtinham propriedades emulsificantes ideais com um máximo de 15% de GH, acima deste valor a atividade emulsificante dos hidrolisados decaía. Eles ainda relatam que ótimas propriedades emulsificantes de caseína hidrolisada com tripsina eram observadas com um GH de 8% e que as propriedades emulsificantes decaíam quando o GH alcançava 9,9%.

Várias hipóteses sugerem que a hidrofobicidade de superfície é uma das características de maior influência para definir o comportamento das proteínas e, conseqüentemente, suas propriedades de emulsificação e formação de espuma. A capacidade emulsificante das proteínas depende de um satisfatório balanço entre características hidrofílicas e lipofílicas, em lugar de somente um valor elevado de cada característica. No entanto, a estabilidade das emulsões não depende deste balanço, mas da magnitude das características hidrofílicas e lipofílicas das proteínas (MAHMOUD, 1994).

Devido à baixa capacidade emulsificante apresentada pelos hidrolisados obtidos nesse trabalho, não se pode esperar que eles sejam bons aditivos funcionais para alimentos, como por exemplo, alimentos do tipo salsicha.

4.5.2.2 Capacidade de retenção de óleo (CRO)

Através da Tabela 4.19 observamos os valores obtidos de capacidade de retenção de óleo dos hidrolisados de baixo e alto grau de hidrólise obtidos a partir da hidrólise das proteínas de peito e coxa de frango com as enzimas Alcalase e Flavourzyme.

Tabela 4.19 – Valores de capacidade de retenção de óleo obtidos para os hidrolisados protéicos de carne de frango e para os músculos *in natura* de peito e coxa de frango.

Amostras	Substrato - Enzima	GH (%)	CRO (mL óleo/ g prot)*
H1	Peito - Alcalase	21,85	3,97 ^a
H2	Coxa - Alcalase	20,40	1,33 ^c
H3	Peito - Alcalase	53,25	3,57 ^a
H4	Coxa - Alcalase	37,64	1,33 ^c
H5	Peito - Flavourzyme	14,26	3,67 ^a
H6	Coxa - Flavourzyme	6,34	2,50 ^b
H7	Peito - Flavourzyme	36,18	3,50 ^a
H8	Coxa - Flavourzyme	19,85	2,50 ^b
Peito in.	-	-	3,33 ^a
Coxa in.	-	-	1,17 ^c

Letras minúsculas diferentes na vertical indicam haver diferença significativa ($p < 0,05$) de CRO entre as amostras. GH = grau de hidrólise. * Valor médio de três determinações da mesma amostra.

Observando a Tabela 4.19 verificou-se que os valores de capacidade de retenção de óleo dos hidrolisados obtidos com peito de frango para ambas as enzimas, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, sendo que para os hidrolisados obtidos com coxa de frango observou-se uma diferença significativa entre os hidrolisados obtidos com as diferentes enzimas, onde os valores de CRO para Flavourzyme foram maiores que para Alcalase. Resultados semelhantes foram encontrados por CENTENARO (2007) que obteve valores de CRO de hidrolisados com a enzima Alcalase entre 1,12 e 3,90 mL óleo/ g prot, sendo todos valores inferiores ao músculo *in natura* de corvina (*Micropogonias furnieri*) utilizado, que

apresentou um valor de 6,3 mL óleo/ g prot. GBOGOURI *et al.* (2004) avaliaram as propriedades funcionais das proteínas hidrolisadas de cabeças de salmão com a enzima Alcalase e observaram que os valores obtidos de CRO para os hidrolisados com valores de GH de 11,5% e 17,3% apresentavam valores de 2,8 e 3,55 g óleo/ g proteína respectivamente, sendo estes valores de CRO maiores que o padrão de caseinato de sódio de 2,33 g óleo/ g proteína, mas todos inferiores ao valor apresentado pela proteína não hidrolisada das cabeças de salmão (10,67 g óleo/ g proteína). Já SANTOS (2006) encontrou valores de CRO de hidrolisados protéicos de cabrina (*Prionotos punctatus*) com as enzimas Alcalase e Flavourzyme (45,05 e 55,23 g óleo/ 100 g amostra) maiores em relação a matéria-prima utilizada (7,30 g óleo/ 100 g amostra). FONKWE e SINGH hidrolisaram resíduos de carne mecanicamente separada de peru com papaína, e obtiveram um produto pobre em CRO, com um valor de aproximadamente 1 mL por grama de hidrolisado.

Todos os hidrolisados obtidos com peito de frango apresentaram uma CRO significativamente maior dos que os hidrolisados de coxa de frango independente do GH. Comparando os valores de CRO da carne *in natura* com os hidrolisados verificou-se que o peito *in natura* não apresentou uma diferença significativa com os hidrolisados de peito de frango para ambas as enzimas, o que demonstrou não haver influência do grau de hidrólise nesta propriedade nas condições estudadas. Por outro lado, a coxa *in natura* não apresentou uma diferença significativa com os hidrolisados obtidos com a enzima Alcalase. Porém verificou-se uma diferença significante entre coxa *in natura* e os hidrolisados obtidos com a enzima Flavourzyme, obtendo-se valores maiores de CRO para os hidrolisados quando comparados à matéria-prima, demonstrando que neste caso houve um efeito benéfico da hidrólise enzimática nesta propriedade.

O grau de hidrólise não apresentou nenhum efeito na capacidade de retenção de óleo dos hidrolisados, sendo que os hidrolisados de baixo grau de hidrólise (H1, H3, H5 e H7) não apresentaram diferença significativa em relação aos hidrolisados de alto grau de hidrólise correspondentes (H2, H4, H6 e H8). DINIZ e MARTIN (1997) obtiveram reduzidos valores de CRO para hidrolisados de proteína de tubarão com a enzima Alcalase, embora as amostras com GH de 13,0 e 18,8% tenham apresentado maiores valores de CRO do que com GH de 6,5% (isto não apresentava diferença significativa). Segundo QI *et al.* (1997) o aumento da hidrofobicidade das proteínas poderia ser devido à exposição de grupos hidrofóbicos resultantes do desdobramento durante a hidrólise da proteína. Em geral, grupos hidrofóbicos estão localizados no

interior da estrutura de proteínas nativas. Após uma parcial hidrólise pelas enzimas, alguns dos grupos hidrofóbicos poderiam ser expostos, resultando em um aumento da hidrofobicidade. O aumento de grupos hidrofóbicos facilitaria as interações entre grupos hidrofóbicos e óleo.

Em nosso trabalho, se verificou uma melhoria desta propriedade somente nos hidrolisados de coxa com a enzima Flavourzyme, que apresentaram um aumento nos valores de CRO em relação à carne *in natura*.

4.5.2.3 Propriedades espumantes

4.5.2.3.1 Capacidade de formação de espuma (CFE)

A Tabela 4.20 apresenta os valores de capacidade de formação de espuma (CFE) dos hidrolisados de baixo e alto grau de hidrólise obtidos a partir da hidrólise das proteínas de peito e coxa de frango com as enzimas Alcalase e Flavourzyme.

Tabela 4.20 – Valores de capacidade de formação de espuma (CFE) dos hidrolisados protéicos e dos músculos *in natura* de peito e coxa de frango.

Amostras	Substrato - Enzima	GH (%)	CFE (%)*
H1	Peito - Alcalase	21,85	18,0 ^{bc}
H2	Coxa - Alcalase	20,40	12,0 ^{bc}
H3	Peito - Alcalase	53,25	57,3 ^a
H4	Coxa - Alcalase	37,64	10,0 ^c
H5	Peito - Flavourzyme	14,26	12,0 ^{bc}
H6	Coxa - Flavourzyme	6,34	10,0 ^c
H7	Peito - Flavourzyme	36,18	16,0 ^{bc}
H8	Coxa - Flavourzyme	19,85	12,0 ^{bc}
Peito in.	-	-	15,0 ^{bc}
Coxa in.	-	-	20,0 ^b

Letras minúsculas diferentes na vertical indicam haver diferença significativa ($p < 0,05$) de CE entre as amostras. GH = grau de hidrólise. * Valor médio de três determinações da mesma amostra.

Observando a Tabela 4.20 constatou-se que os hidrolisados apresentaram valores de formação de espuma variando na faixa de 10 a 18%, e que somente o hidrolisado H3 obtido com peito de frango com a enzima Alcalase apresentou um valor maior (57,3%), que se diferenciou do resto dos hidrolisados e da matéria-prima *in natura*. Nenhum dos hidrolisados obtidos com a enzima Flavourzyme apresentaram

valor superior a 16% de capacidade de formação de espuma. SURÓWKA e FIK (1992) estudaram a recuperação de proteínas de cabeças de frango com a enzima Neutrase e observaram que o produto estudado apresentava moderadas propriedades espumantes. Segundo CÂNDIDO *et al.* (1998) para formar espuma, a proteína deve se difundir na interface ar/água e se reorientar de forma a baixar a tensão interfacial e se polimerizar. Neste processo, deve ser considerada a tensão interfacial, a viscosidade, a solubilidade e a hidrofobicidade da proteína.

Considerando o corte de carne de frango verificou-se que os hidrolisados obtidos com o peito apresentaram valores ligeiramente superiores de formação de espuma quando comparados com os hidrolisados que utilizaram coxa, sendo que o hidrolisado obtido com peito de frango utilizando a enzima Alcalase (H3) apresentou um valor significativamente bem superior aos demais hidrolisados. O grau de hidrólise apresentou influência leve na capacidade de formação de espuma. Os hidrolisados apresentaram valores semelhantes independentes do GH. Somente pôde-se constatar uma influência clara do GH no hidrolisado de peito de frango com Alcalase (H3), com uma elevada CFE e com um alto GH comparado com o hidrolisado H1 elaborado de peito de frango com a enzima Alcalase. Neste caso o GH teve uma influência positiva e direta nesta propriedade. GOVINDARAJU e SRINIVAS (2006) obtiveram valores de CFE em torno de 46% para hidrolisados de farinha desengordurada de amendoim com a enzima Alcalase em valores de GH entre 3 e 5%, apresentando uma estabilidade de 36% após uma hora de repouso. Porém, após uma extensiva hidrólise o valor de CFE caiu para 23% e a estabilidade foi reduzida para 8,63%.

O peito de frango *in natura* apresentou uma CFE de 15% que não se diferenciou dos hidrolisados de peito, exceto o hidrolisado H3 que apresentou um valor bem superior de CFE. A coxa de frango *in natura* apresentou um valor superior de CFE com relação ao peito *in natura* e também a todos os hidrolisados indicando que a hidrólise enzimática não teve uma influência positiva nesta propriedade. CENTENARO (2007) obteve maiores valores de CFE, a partir de hidrolisados com menores valores de grau de hidrólise, chegando a uma CFE de 38% a partir do hidrolisado de corvina com 12,18% de GH. HRCKOVÀ *et al.* (2002) obtiveram maiores valores de CFE com hidrolisados de farinha desengordurada de soja a partir da enzima Alcalase, do que com a enzima Flavourzyme, mas os hidrolisados obtidos com a enzima Flavourzyme apresentavam maior estabilidade. Estes autores observaram que, em geral, o tratamento enzimático aumentou a CFE, mas a estabilidade da espuma era reduzida

marcadamente em cada instante, indicando que para uma boa estabilidade é necessária uma proteína parcialmente hidrolisada.

4.5.2.3.2 Estabilidade de espuma (EEs)

A Tabela 4.21 apresenta os valores da estabilidade da espuma referente aos hidrolisados e as matérias-primas utilizadas no processo de hidrólise enzimática. A Figura 4.21 representa graficamente o comportamento apresentado por estes hidrolisados e suas matérias-primas *in natura*.

Tabela 4.21 – Estabilidade de espuma (EEs) formada pelos hidrolisados protéicos e pelos músculos *in natura* dos cortes de frango ao longo do tempo.

Amostra	Estabilidade da espuma (%)*				
	1 min	5 min	10 min	30 min	60 min
H1	70,4 ^A	48,1 ^B	40,7 ^B	37,0 ^B	37,0 ^B
H2	83,3 ^A	66,7 ^B	66,7 ^B	66,7 ^B	58,3 ^B
H3	91,8 ^A	80,5 ^B	66,6 ^C	66,6 ^C	62,6 ^C
H4	80,0 ^A	65,0 ^B	61,1 ^B	58,3 ^B	56,1 ^B
H5	83,3 ^A	60,0 ^A	33,3 ^B	5,6 ^B	0,0 ^C
H6	85,0 ^A	70,0 ^{AB}	55,0 ^{BC}	40,0 ^{CD}	25,0 ^D
H7	86,9 ^A	54,7 ^B	41,0 ^B	36,3 ^B	36,3 ^B
H8	83,3 ^A	66,7 ^B	66,7 ^B	66,7 ^B	66,7 ^B
Peito in.	80,0 ^A	66,7 ^B	53,3 ^C	53,3 ^C	43,3 ^C
Coxa in.	100,0 ^A	100,0 ^A	92,5 ^B	92,5 ^B	90,0 ^B

Letras maiúsculas diferentes na vertical indicam haver diferença significativa ($p < 0,05$) de EEs ao longo do tempo. * Valor médio de três determinações da mesma amostra.

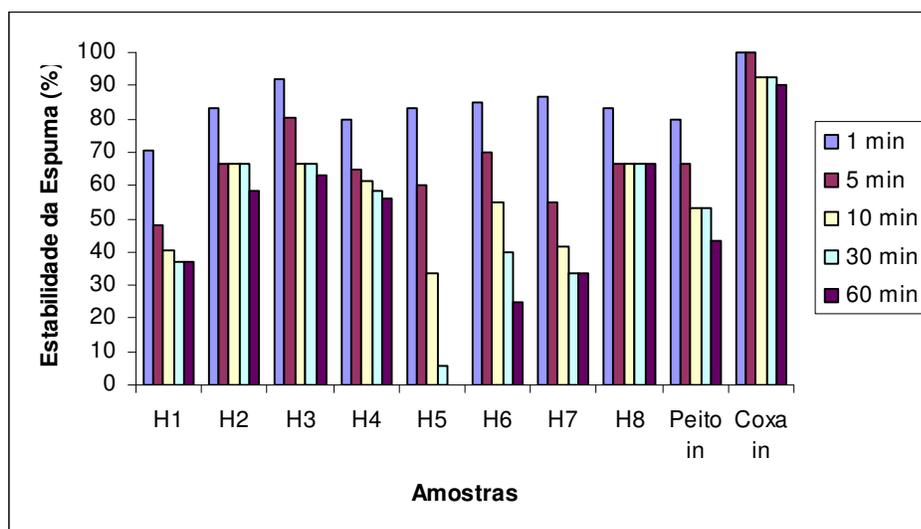


Figura 4.12 – Estabilidade de espuma apresentada pelos hidrolisados protéicos e pelos músculos *in natura* dos cortes de frango ao longo do tempo. Onde: H1 = hidrolisado de baixo GH obtido a partir de peito com Alcalase; H2 = hidrolisado de baixo GH obtido a partir de coxa com Alcalase; H3 = hidrolisado de alto GH obtido a partir de peito com Alcalase; H4 = hidrolisado de alto GH obtido a partir de coxa com Alcalase; H5 = hidrolisado de baixo GH obtido a partir de peito com Flavourzyme; H6 = hidrolisado de baixo GH obtido a partir de coxa com Flavourzyme; H7 = hidrolisado de alto GH obtido a partir de peito com Flavourzyme e H8 = hidrolisado de alto GH obtido a partir de coxa com Flavourzyme.

Através da Tabela 4.21 e da Figura 4.12 podemos observar que em relação à estabilidade da espuma apresentada pelos hidrolisados, o hidrolisado H8 foi o que apresentou uma maior estabilidade, sendo que após um minuto de repouso, sua espuma não apresentou nenhuma redução, porém este hidrolisado apresentou baixa capacidade de formação de espuma. O hidrolisado H5 foi o que apresentou a menor estabilidade de espuma, chegando à zero ao final de 60 minutos de repouso. Todos os hidrolisados obtidos apresentaram reduções significativas ao longo do tempo, sendo que os hidrolisados H1, H2, H4, H7 e H8, não apresentaram uma redução significativa após 1 minuto de repouso, indicando uma boa estabilidade espumante.

Comparando a estabilidade de espuma da matéria-prima *in natura*, verificou-se que a coxa apresentou uma estabilidade bem superior ao peito, que se mostrou menos estável. Esta característica também foi apresentada pelos hidrolisados, sendo que aqueles obtidos a partir de peito (H1, H3, H5 e H7) desenvolveram uma diminuição acentuada dos valores de estabilidade ao longo do tempo, quando comparados com os hidrolisados obtidos de coxa de frango, que se mostraram mais

estáveis. CENTENARO (2007) obteve hidrolisados enzimáticos de corvina com excelente estabilidade espumante, sendo que após 60 minutos de repouso, a espuma não apresentou redução inferior a 95% em nenhum dos hidrolisados nem no músculo de corvina *in natura*. Em relação ao GH dos hidrolisados juntamente com a enzima utilizada, os hidrolisados obtidos com a enzima Alcalase de baixo (H2) e de alto (H3 e H4) grau de hidrólise e os hidrolisados obtidos com a enzima Flavourzyme com alto GH (H7 e H8), apresentaram espumas mais estáveis do que os demais hidrolisados.

DINIZ e MARTIN (1997) relataram que dispersões protéicas causam uma redução na tensão superficial da interface ar-água, aumentando assim a capacidade de formação de espuma. Estes autores sugeriram que uma elevação na atividade superficial, provavelmente devido ao maior número de cadeias polipeptídicas que surgem da proteólise parcial, permite que mais ar seja incorporado à mistura. De acordo com CLAVER e ZHOU (2005) o tratamento enzimático aumenta a formação de espuma, mas a estabilidade espumante é marcadamente reduzida em cada instante. ROMAN e SGARBIERI (2005) também observaram, em seu estudo sobre as propriedades funcionais de caseína bovina hidrolisada pela enzima Flavourzyme que a estabilidade da espuma diminui e a capacidade de formação de espuma aumenta com o aumento do grau de hidrólise, sugerindo que as propriedades moleculares afetam a capacidade de formação e a estabilidade de espuma dos hidrolisados de forma diferente. Estes autores relataram que apesar de pequenos peptídeos se difundirem rapidamente na interface e serem adsorvidos, eles foram menos eficientes na redução da tensão superficial, por dificuldade de se reorientarem na interface água-ar e formarem uma membrana contínua visco-elástica. Nossos resultados concordam em parte com estes autores, no que diz respeito à CFE dos hidrolisados. Constatamos que o hidrolisado de maior GH (H3), apresentou a maior formação de espuma com uma alta estabilidade, inferior apenas ao hidrolisado H8 que apresentou uma baixa capacidade de formação de espuma.

Se compararmos a estabilidade de espuma dos hidrolisados com a carne *in natura* verifica-se que a coxa de frango apresentou os valores mais altos ao longo dos 60 minutos, valores superiores que o peito. Esta característica se relacionou com os hidrolisados obtidos, conferindo aos hidrolisados de coxa com alto e baixo grau de hidrólise (H2, H6 e H8) espumas com maior estabilidade que os hidrolisados de peito com alto e baixo grau de hidrólise (H1, H5 e H7). Apenas os hidrolisados H3 e H4 apresentaram comportamento contrário, mas com pouca diferença entre suas estabilidades. De acordo com LICEAGA-GESUALDO e LI-CHAN (1999) a hidrólise de

proteínas produz uma gama de peptídeos que possuem alternada hidrofobicidade, equilíbrio de cargas e conformação diferentes comparados com a molécula nativa. Esta redução no peso molecular os torna mais flexíveis formando uma camada interfacial estável e aumentando a taxa de difusão para a interface, melhorando as propriedades espumantes. Estes autores ainda relataram que as proteínas que mantêm a sua estrutura terciária na interface, apresentarão uma extensiva rede intermolecular (interações proteína-proteína), formando filmes fortes que resultarão em uma espuma mais estável. As características estruturais das proteínas, como baixo peso molecular, contribuem para a rápida formação de espuma, mas elas podem não ser ideais na formação das interações proteína-proteína que originam espumas estáveis. Isto vem a concordar por que a coxa *in natura* apresentou baixa formação de espuma, porém a maior estabilidade se comparada com as demais amostras. Segundo SGARBIERI (1998) a capacidade de formar espuma estável em presença de ar, é uma propriedade funcional importante das proteínas em muitos produtos alimentícios do tipo bolos de anjo, suspiros, suflês, vários tipos de coberturas de bolos e sobremesas, além de bebidas como as cervejas.

4.6 Digestibilidade *in vitro*

A Tabela 4.22 apresenta os valores de digestibilidade dos hidrolisados de baixo e alto grau de hidrólise obtidos a partir da hidrólise das proteínas de peito e coxa de frango com as enzimas Alcalase e Flavourzyme. Podemos observar através da Tabela 4.22 que os hidrolisados com maiores GH obtidos com a enzima Alcalase (H3 e H4) foram os que apresentaram um valor de digestibilidade significativamente maior que as demais amostras. Os hidrolisados de alto GH obtidos com a enzima Flavourzyme também apresentaram maiores valores de digestibilidade comparados com os hidrolisados de menor GH elaborados com as respectivas matérias-primas, não sendo significativa a diferença para o hidrolisado de coxa de frango. CENTENARO (2007) constatou uma relação direta do GH com a digestibilidade para os hidrolisados de corvina (*Micropogonias furnieri*) obtidos com a enzima Alcalase. Os hidrolisados com alto GH apresentaram altos valores de digestibilidade, superiores a 96%, e os hidrolisados com baixo GH apresentaram menores valores de digestibilidade. Este autor ainda salientou que moléculas protéicas de menores pesos moleculares são facilmente digeridas pelas enzimas do trato digestivo, aumentando sua absorção e valor nutritivo.

Tabela 4.22 - Digestibilidade *in vitro* dos hidrolisados de carne de frango e dos cortes *in natura*.

Amostra	Substrato - Enzima	GH (%)	Digestibilidade (%)
H1	Peito - Alcalase	21,85	81,75 ^b
H2	Coxa - Alcalase	20,40	82,52 ^b
H3	Peito - Alcalase	53,25	97,76 ^a
H4	Coxa - Alcalase	37,64	93,70 ^a
H5	Peito - Flavourzyme	14,26	71,90 ^d
H6	Coxa - Flavourzyme	6,34	75,45 ^{dc}
H7	Peito - Flavourzyme	36,18	84,18 ^b
H8	Coxa - Flavourzyme	19,85	78,80 ^{cb}
Peito in.	-	-	84,77 ^b
Coxa in.	-	-	82,56 ^b

Letras minúsculas diferentes na vertical indicam haver diferença significativa ($p < 0,05$) de digestibilidade entre as amostras. GH = grau de hidrólise. * Valor médio de três determinações da mesma amostra.

ABDUL-HAMID *et al.* (2002) encontraram valores de digestibilidade *in vitro* para hidrolisados protéicos de tilapia negra (*Oreochromus mossambicus*) com a enzima Alcalase próximos aos encontrados em nosso estudo, onde obtiveram valores de digestibilidade entre 88,4 e 92%. CÂNDIDO E SGARBIERI (2003) avaliaram nutricionalmente duas frações protéicas, após a hidrólise de tilapia do Nilo (*Oreochromus niloticus*) com a enzima Flavourzyme, com um GH de 25%, uma solúvel e outra insolúvel, e obtiveram elevados valores de digestibilidade, 95,4 e 93,8% respectivamente.

Os hidrolisados de baixo GH obtidos com a enzima Flavourzyme apresentaram valores de digestibilidade significativamente menores em relação à matéria-prima *in natura*. Como estes hidrolisados provavelmente apresentam peptídeos de maior peso molecular, estes podem ter sofrido certo grau de desnaturação durante o processo de secagem, acarretando em perda nutricional, que se manifestou em menor digestibilidade. Segundo SGARBIERI (1996) a desnaturação das proteínas tende a melhorar a digestibilidade, por facilitar a ação proteolítica das enzimas digestivas, porém, com a desnaturação, principalmente sob a ação do calor, promovem-se reações e/ou interações da proteína com outros componentes do alimento, podendo resultar em decréscimo da digestibilidade. BHASKAR *et al.* (2007) constataram que

uma menor digestibilidade da proteína hidrolisada de vísceras de ovelha, comparada com uma proteína pura como a caseína, poderia ter sido devido a efeitos causados pelo conteúdo de gordura presente na amostra e pelas condições de processamento.

Os valores relativamente elevados de digestibilidade encontrados nesse trabalho, tornam a proteína hidrolisada de carne de frango um satisfatório suplemento nutricional em vários produtos alimentícios, pois observou-se que os hidrolisados com maiores valores de GH apresentaram elevada digestibilidade.

Através de uma avaliação global das propriedades funcionais dos hidrolisados obtidos de carne de frango com as enzimas Alcalase e Flavourzyme com diferentes graus de hidrólise, observa-se que para os hidrolisados obtidos com Alcalase obtiveram-se maiores valores de solubilidade, capacidade de formação de espuma, estabilidade espumante e de digestibilidade do que os hidrolisados obtidos com a enzima Flavourzyme, o que também está relacionado com os valores de grau de hidrólise maiores apresentados pela enzima Alcalase. Já os hidrolisados obtidos com a enzima Flavourzyme, contrariamente, apresentaram maiores valores de capacidade de retenção de água e das propriedades emulsificantes.

Considerando os hidrolisados com relação às matérias-primas *in natura*, conseguiram-se aumentos de solubilidade nos hidrolisados obtidos com Alcalase, tanto para o peito quanto para coxa de frango. Os hidrolisados obtidos com a enzima Flavourzyme apresentaram pequenos aumentos de capacidade de retenção de água quando comparados com a matéria-prima *in natura*. A capacidade emulsificante dos hidrolisados foi menor que a da matéria-prima, obtendo os hidrolisados com Flavourzyme valores superiores aos apresentados pelos hidrolisados com Alcalase. Para a capacidade de retenção de óleo, não houve grande variação dos valores desta propriedade entre os hidrolisados e a matéria-prima, apresentando os hidrolisados com Flavourzyme pequenos aumentos, maiores nos elaborados com coxa de frango. Na capacidade de formação de espuma, os hidrolisados não apresentaram aumento dos valores desta propriedade, exceto para o hidrolisado de peito com Alcalase, que atingiu 185% do valor de CFE apresentado pelo peito *in natura*. Em relação à estabilidade espumante a coxa *in natura* foi a que apresentou os maiores valores. Considerando a digestibilidade, os hidrolisados obtidos mediante o uso de Alcalase com alto grau de hidrólise foram os que apresentaram valores maiores de digestibilidade quando comparados à matéria-prima. É importante lembrar que os hidrolisados foram submetidos a uma etapa de secagem que deve ter influenciado

nesta propriedade e com mais intensidade nos hidrolisados obtidos com Flavourzyme que não conseguiram obter valores de digestibilidade superiores à matéria-prima.

O importante nesses resultados foi à obtenção de hidrolisados com diferentes propriedades funcionais, em alguns casos, com melhores propriedades que a matéria-prima *in natura*. O fato de se ter conseguido hidrolisados com diferentes propriedades funcionais reside principalmente pelo modo de ação proteolítica da Alcalase e da Flavourzyme. Observou-se que os hidrolisados obtidos com a enzima Alcalase, apresentaram valores de grau de hidrólise altos, o que favoreceu as propriedades ligadas a solubilidade, ou seja, relacionadas com as características hidrofílicas das proteínas. Por outro lado, os hidrolisados obtidos com a enzima Flavourzyme, apresentaram valores de grau de hidrólise baixos, o que favoreceu as propriedades emulsificantes, ou seja, ligadas às características hidrofóbicas das proteínas. Estas diferenças entre os hidrolisados devem-se primeiramente a matéria-prima (peito e coxa), e com certeza a diferente maneira de atuação das enzimas utilizadas, a sua diferente especificidade pelo substrato e a diferente atividade proteolítica.

5. CONCLUSÃO

Obteve-se hidrolisados enzimáticos de peito e coxa de frango com diferentes valores de grau de hidrólise, maiores para os obtidos com a enzima Alcalase comparados com aqueles obtidos com a enzima Flavourzyme.

As variáveis concentração de substrato, concentração de enzima e tempo de hidrólise apresentaram na maioria dos ensaios de hidrólise efeitos significativos no grau de hidrólise das proteínas, permitindo a obtenção de modelos matemáticos preditivos que relacionaram a variável resposta com as variáveis independentes.

O comportamento dos hidrolisados na operação de secagem apresentou-se diferente em relação à enzima utilizada e ao grau de hidrólise, sugerindo uma influência do tamanho molecular dos peptídeos, da concentração de proteínas e outros componentes, nos hidrolisados úmidos.

Os hidrolisados obtidos pela hidrólise com enzima Alcalase apresentaram maiores valores de solubilidade, de capacidade de formação e estabilidade de espuma e de digestibilidade que os hidrolisados obtidos com a enzima Flavourzyme, que apresentaram maiores valores de capacidade de retenção de água, de capacidade emulsificante e de capacidade de retenção de óleo.

O grau de hidrólise mostrou uma relação direta com a solubilidade, a digestibilidade, a capacidade de formação de espuma e de estabilidade de espuma, e uma relação inversa com a capacidade de retenção de água e com a capacidade emulsificante. Não foi possível observar uma relação clara do grau de hidrólise com a capacidade de retenção de óleo.

Com relação à matéria-prima *in natura*, os hidrolisados apresentaram diferente comportamento das propriedades funcionais. A solubilidade, a estabilidade de espuma e a digestibilidade apresentaram acréscimos nos valores dos hidrolisados, indicando um efeito positivo da hidrólise das proteínas nestas propriedades. Por outro lado, a capacidade de retenção de óleo e a capacidade de formação de espuma dos hidrolisados mostraram pouca alteração com relação à matéria-prima *in natura*, enquanto a capacidade emulsificante dos hidrolisados diminuiu, mostrando um efeito negativo da hidrólise nesta propriedade.

Os hidrolisados apresentaram diferentes características que se relacionaram com o tipo de matéria-prima e a enzima utilizada, resultando em propriedades funcionais diferenciadas que permitem direcioná-los para a aplicação como ingredientes de produtos alimentícios, dependendo do efeito tecnológico desejado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-HAMID, A.; BAKAR. J.; BEE, H. H. Nutritional quality spray dried protein hydrolysate from black tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Food Chemistry**. v. 78, p 69 -74, 2002.

ABEF, Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango. Disponível em: <<http://www.abef.com.br>>. Acesso em: 22 de dezembro de 2007..

ADLER-NISSEN, J.; OLSON, H. S.; The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. **In: Functionality and Protein Structure**, A. Pour-EL (Ed.), p. 125 -146. American Chemical Society. Symposium Series 92, Washington, DC, 1979.

A.O.A.C. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. **Association of Official Analytical Chemists.**, 16^a edition, v. 1-2, USA. 1995.

ARCHER, M. C.; RAGNARSSON, J. O.; TANNENBAUM, S. R.; WANG, D. I. C. Enzymatic solubilization of an insoluble substrate, fish protein concentrate: process and kinetic considerations. **Biotechnol. and Bioeng.** v. 15, p. 181, 1973.

ASPMO, S. I.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 1957 - 1966, 2005.

BAEK, H. H.; CADWALLADER. K. R. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. **Journal of Food Science**. v. 60 (5), p. 929 – 935, 1995.

BARBUT, S. **Poultry Products Processing in Industry**. Department of Animal and Poultry Science University of Guelph. CRC Press CLL, N.W. Corporate Blvd, Boca Raton, Florida, 2000.

BEDDOWS, C. G.; ARDESHIR, A. G. The production of soluble fish protein solution for use in fish sauce manufacture. **Journal Food Technology**. v. 14, p. 603 -612, 1979.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Química de los Alimentos**. 2ª edição. Editora Acribia, S.A. Zaragoza. Espanha. 1997.

BENJAKUL, B.; MORRISSEY, M. T. Protein hydrolysates from pacific whiting solid waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3424, 1997.

BOBBIO, Florinda O.; BOBBIO, Paulo A.; **Introdução à Química de Alimentos**. 2ª edição, Livraria Varela. São Paulo, SP, 1992.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO P.A. **Manual de Laboratório de Química de Alimentos**. Livraria Varela. São Paulo, SP, 1995.

BHASKAR, N.; MODI, V. K.; GOVINDARAJU, K.; RADHA, C.; LATITHA, R. G. Utilization of meat industry by products: Protein hydrolysate from sheep visceral mass. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 338 – 394, 2007.

BIANCHI, S. I. P. **Influência da Secagem nas Propriedades Funcionais de Polpa de Pescado**. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 75 - 81 p., 2006.

BRASIL, Ministério da agricultura. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005**. Aprova o "Regulamento Técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos".

BRASIL, Ministério da agricultura. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 273, de 22 de setembro de 2005**. Aprova o "Pós para o preparo de alimentos".

BURICA, O.; VITEZ, L. Effect of bromelain on the protein complex of chicken meat. **Technologija Mesa**. v. 22, p. 26 – 30, 1981.

CÂNDIDO, L. M. B.; NOGUEIRA, A. K.; SGARBIERI, V. C.; Propriedades funcionais de concentrados protéicos de pescado preparados por vários métodos. **Brazilian Journal Food Technology**. v. 1, p. 77 – 89, 1998.

CÂNDIDO, L. M. B.; SGARBIERI, V. C.; Enzymatic hydrolysis of Nile tilapia (*Oreochromus niloticus*) myofibrillar proteins: effects on nutritional and hydrophilic properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 83, p. 937 – 944, 2003.

CENTENARO, G. S. **Efeito do Grau de Hidrólise nas Propriedades Funcionais de Hidrolisados Protéicos de Corvina (*Micropogonias furnieri*)**. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 42 - 77 p., 2007.

CHEFTEL, J. C.; CHEFTEL, H. **Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos**. Vol. I, Ed. Acribia, Zaragoza, España, 1976.

CHERIFE, J. Fundamentals of the drying mechanism during air dehydration of foods. **Advances in drying**. Washington hemisphere Publishing Corporation, v. 1, p. 73 – 102, 1983.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L.; Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 14, p. 438 – 443, 2003.

CLAVER, I. P.; ZHOU, H. Enzymatic hydrolysis of defatted wheat germ by proteases and the functional properties of resulting protein hydrolysates. **Journal of Food Biochemistry**. v. 29, p 13 -16, 2005.

CLEMENTE, A.; VIOQUE, J.; SÁNCHEZ-VIOQUE, R.; PEDROCHE, J.; BAUTISTA, J.; MILLÁN, F. Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. **Food Chemistry**. v. 67, p. 269 – 274, 1999.

CORDLE, C. T.; Control of Allergies Using Protein Hydrolysates. **Food Technology**. p. 72 – 76, 1994.

COULTATE. T.P. **Alimentos Química de seus Componentes**. 3ª edição, Editada Artmed, Porto Alegre, RS, 2004.

DAUKSAS, E.; FALCH, E.; SLIZYTE, R.; RUSTAD, T. Composition of fatty acids and lipid classes in bulk products generated during enzymic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochemistry**. v. 40, p 2659 – 2670, 2005.

DIPACK, K.; KUMAR, K. D. Functional properties of rapeseed protein products with varying phytic acid contents. **Journal of Agricultural Chemistry**, v. 34, p. 775 – 777, 1986.

DINIZ, E. M.; MARTIN, A. M.; Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysates. **Lebensm. Wiss. u. Technology**. v. 30, p 266 – 272, 1997.

DONADEL, M. E.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Propriedades funcionais de concentrado protéico de feijão envelhecido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 19, p. 380 - 386, 1999.

DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; BERGÉ, J. P. Improvement of lipid and phospholipids recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. **Process Biochemistry**. v. 41, p. 2327 – 2332, 2006.

ELIZALDE, B. E.; KANTEREWICZ, R. J.; PILOSOFF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. Physicochemical properties of food proteins related to their ability to stabilize oil-in-water emulsions. **Journal of Food Science**. v. 53 (3), p 845 – 848, 1988.

ELIZALDE, B. E.; BARTHOLOMAI, G. B.; PILOSOFF, A. M. R. The effect of pH on the relationship between hydrophilic/lipophilic characteristics and emulsification properties of soy proteins. **Lebensm. Wiss. u. Technology**. v. 29, p 334 – 339, 1996.

FARFÁN, J. A. **Química de Proteínas Aplicada a Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Editora da Unicamp, Campinas, SP, 1990.

FENNEMA, O. R. **Química de los Alimentos**. Editora Acribia, S. A. Zaragoza, Espanha, 1993.

FONKWE, L. G.; SINGH, R. K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**. v. 31, p. 605-616. 1996.

FOUST, A. S.; WENZEL, L. A.; CLUMP L. W. **Princípios das Operações Unitárias**. 2ª Ed. Livros Técnicos e Científicos. 1980.

FROKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. **Food Technology**. v. 48, p. 68-71, 1994.

FURLAN, E. F.; OETTERER. M.; Hidrolisado protéico de pescado. **Revista de Ciência e Tecnologia**. v. 10(9), p. 79 -89, 2002.

FURLONG, E. B. **Bioquímica: um enfoque para “Alimentos”**. Edgraf, Rio Grande, RS, 2000.

FURTADO, M. A. M.; GOMES, J. C.; SILVA, C. A. S.; ORNELLAS, C. B.; SILVESTRE, M. P. C. Propriedades funcionais de hidrolisados de proteína láctea co-precipitada. **Ciência Agrotecnológica**. v.25, p. 625 - 639, 2001.

GARCIA, L. V. **Avaliação das Propriedades Funcionais de Anchoita (*Engraulis anchoita*) e das Modificações Produzidas Durante o Armazenamento em Gelo e Água do Mar e Processamento**. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 105 p., 2007.

GBOGOURI, G. A.; LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. **Food Chemistry and Toxicology**. v. 69 (8), p. 615 – 622, 2004.

GEANKOPLIS, C. J. **Transport Process and Unit Operation**. 3ª edição, PTR-Prentice-Hall, 1993.

GILDBERG, A.; Enzymic Processing of Marine Raw Materials. **Process Biochemistry**. v. 28, p. 1 - 15, 1993.

GILDBERG, A.; ARNESEN, J. A.; CARLEHÖG, M. Utilization of cod backbone by biochemical fractionation. **Process Biochemistry**. v. 38, p. 475 - 480, 2002.

GLÓRIA, M. M.; REGINATO-D'ARCE, M. A. B. Concentrado e isolado protéico de torta de castanha do Pará: Obtenção e caracterização química e funcional. **Ciência e Tecnologia de alimentos**. v. 20 (2), p. 240 – 245, 2000.

GONZALES-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PAEZ, M. P.; GUADIX, E. M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. I. Kinetic models. **Biotechnology Bioengineering**. v. 44, p. 523, 1994.

GOVINDARAJU, K.; SRINIVAS, H. Studies on the effects of enzymatic hydrolysis on functional and physico-chemical properties of arachin. **Lebensm. Wiss. u. Technology**. v. 39, p. 54 -62, 2006.

GUERARD, F.; GUIMAS, L.; BINET, A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic**. v. 19 – 20, p. 489 – 498, 2002.

HALE, M. B. **Making Fish Protein Concentrates By Enzymatic Hydrolysis**. A status report on research and some processes and products studied by NMFS. NOAA Technical Report NMFS SSRF-657, Seattle, WA, 1972.

KILCAWLEY, K. N.; WILKINSON, M. G.; FOX, P. F. Determination of key enzyme activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, p. 2002.

HOYLE, N. T.; MERRITT, J. H. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**. v. 59 (1), p. 76 – 79, 1994.

HOCKOVÀ, M.; RUNSÀHOVÀ, M.; ZEMANOVIC, J. Enzymatic Hydrolysis of Defatted Soy flour by three different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. **Czech Journal Food science**. v. 20 (1), p. 7 – 14, 2002.

HUALLANCO, M. B. A. **Aplicação de um Sistema de Classificação de carcaças e Cortes e Efeito Pós Abate da Qualidade de Cortes de Frango Criados no Sistema Alternativo. Dissertação de Mestrado.** Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, 48 - 54 p., 2004.

ISHIDA, K. YAMAMOTO, A. Studies on flavoring substances. Part III. Enzymatic hydrolysis of chicken meat and flavor of the hydrolysates. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 24, p. 1005 – 1012, 1976.

ISHIDA, K. KAJI, Y.; YAMAMOTO, A. Studies on natural flavoring substances. Part V. Enzymatic hydrolysis of chicken meat and flavor of the hydrolysates. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 26, p. 168 – 174, 1979.

KALIL, S.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 539, 2000.

KENNEDY, J. F. **Enzyme technology.** In: REHM, H. J.; REED, G. (Eds.) **Biotechnology.** V. 7a. Weinheim: VCH, 1987.

KILCAWLEY, N. K.; WILKINSON, M. G.; FOX, P. F. Determination of key enzyme activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 31, p. 310 – 320, 2002.

KINSELLA, J. E.; Milk proteins: physicochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.** v. 21, p. 197 – 262, 1984.

KONISHI, Y.; KOBAYASHI, M. Characteristic innovation of food drying process revealed by the physicochemical analysis of dehydration dynamics. **Journal of Food Engineering**, v. 59, p. 27 – 28, 2003.

KRISHNAMURTHY, G.; CHANG, H.; HULTIN, H. O.; FENG, Y. Solubility of chicken breast muscle proteins in solutions of low ionic strength. **Journal of Agriculture and Food Chemistry.** v. 44, p. 408 – 415, 1996.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 40, p. 43. 2000^a.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo solar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry**. v. 36, p. 131 - 139, 2000^b.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Biochemical and functional properties of atlantic salmon (*Salmo solar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 48, p. 657 - 666, 2000^c.

LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**. v. 58, p. 68 - 71, 1994.

LIM, L. C.; TAISRIN, S. M.; RAMLI, W.; DAUD, W. Derivation of new drying model from theoretical diffusion controlled drying period. **Drying 2004 –Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS 2004)**. São Paulo, Brazil, v. A, p. 430 – 435, 2004.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. **Journal Biol. Chem.** 193, p. 265 – 275, 1951.

LEE, J.; LEE, D. H.; LEE, C. Characterization of hydrolysates produced by mild-acid treatment and enzymatic hydrolysis of defatted soybean flour. **Food Research International**. v. 34, p. 217 – 222, 2001.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2^a edição, editora Sarvier, São Paulo, SP, 1995.

LICEAGA-GESUALDO, A. M.; LI-CHAN, E. C. Y. Funcional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**. v. 64 (6), p. 1000 – 1004, 1999.

LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M.; SERGENT, M.; PHAN-THAN-LUU, R. Protein recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis. **Journal Food Science**. v. 60 (5), p. 949, 1995.

MACKIE, I. M. Fish protein hydrolysates . **Process Biochemistry**. v. 17, p. 26 -31, 1982.

MAHMOUUD, M. I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technology**. v. 58, p. 89 - 95, 1994.

MAHMOUUD, M. I.; MALONE, W. T.; CORDLE, C. T. Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. **Journal of Food Science**. v. 57 (5), p. 1223 – 1229, 1992.

MORAES, K. **Desenvolvimento de um Processo de Obtenção de Proteína de Anchoita (*Engraulis anchoita*) Modificada Enzimaticamente**. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 9 - 23 p., 2007.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V.; **Manual de soluções, reagentes e solventes**. Ed. Edgard Blücher Ltda, p. 272, 1972.

MORR, V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWIS. B. A.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**. v. 50, p. 1715 - 1718, 1985.

MULLALLY, M. M.; O'CALAGHAN, D. M.; FITZGERALD, R. J.; DONNELLY, W. J.; DALTON, J. P. Proteolytic and peptidolytic activities in commercial pancreatin protease preparations and their relationship to some whey protein hidrolysate characteristics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 2973. 1994.

MULLALLY, M. M.; O'CALAGHAN, D. M.; FITZGERALD, R. J.; DONNELLY, W. J.; DALTON, J. P. Zymogen activation in pancreatic endoproteolytic preparations and

influence on some whey protein characteristics. **Journal of Food Science**. v. 60, p. 227. 1995.

MURUETA, J. H. C.; TORO, M. A. N.; CARREÑO, F. G. Concentrates of fish protein from bycatch species produced by various drying processes. **Food Chemistry**. 2005.

NANTA - **Programas de Alimentação**. Avicultura de Carne. São Paulo, Brasil. Disponível em: <http://www.nanta.es/por/programas/avicultura_carne/index.htm>. Acesso em 19 de setembro de 2006.

NEVES, R. A. M.; MIRA, N. V. M.; MARQUEZ, L. U. M. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 24 (1), p. 101 – 108, 2004.

NETO, B.B.; SCARMINIO, T. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2ª edição, Editora da Unicamp, São Paulo, 1996.

NILSANG, S.; LERTSIRI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; ASSAVANING, A.; Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. **Journal of Food Engineering**. v. 70, p. 571 – 578, 2005.

NIELSEN, P. M.; PETERSEN, D.; DAMBMAN, C. Improved method for determining Food Protein Degree of Hydrolysis. **Food Chemistry and Toxicology**. v. 66 (5), p. 642 – 646, 2001.

NOVO NORDISK A/S. Alcalase. **Enzyme business**, B-259eGB 2000, p. 1 - 3, jan. 1994.

NOWSAD, A. A. K. M.; KANO, S.; NIWA, E.; Thermal gelation characteristics of breast and thigh muscles of spent hen broiler and their surimi. **Meat Science**. v. 54, p. 169 -175, 1999.

OKEZIE, B. O.; BELLO, A. B. Physicochemical and functional properties of winged bean flour and isolate compared with soy isolate. **Journal of Food Science**. v. 53 (2), p. 540 – 454, 1998.

OLIVO, R.; OLIVO, N. **O Mundo das Carnes: Ciência, Tecnologia e Mercado**. Editora do autor. 3ª ed. Criciúma, SC, 2006.

PACHECO, M. T. B.; DIAS, N. F. G.; BALDINI, V. L. S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, p. 333 - 338, 2005.

PAYNAM, D.; KILARA, A. Enchanting the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**. v. 7 (4), p. 120 -125, 1996.

PETERSEN, B. R. Removing bitterness from protein hydrolysates. **Food Technology**. v. 58, p. 96, 1994.

PERRY, R. H.; GREEN, D. W. **Perry's Chemical Engineers' Handbook**. 6º Ed. McGraw Hill. 1984.

PEZOA, V. G.; MELLADO, M. S. Estudo das condições ótimas de pH e temperatura para atividade enzimática de extratos dos componentes do aparelho digestivo da corvina (*Micropogon furneri*) e da castanha (*Umbrina canosa*). **Obtenção de um concentrado de proteínas de pescado para alimentos pelo método enzimático, utilizando as próprias enzimas do pescado**. p. 5 – 38, FURG, Rio Grande, 1979.

PHILLIPS, L. G.; HAQUE, Z.; KINSELLA, J. E. A method for the measurement of foam formation and stability. **Journal of Food Science**. v. 52 (4), 1074 -1075, 1987.

PLUMMER, D. T. **An Introduction to Practical Biochemistry**. McGraw-Hill Book Company (UK) Limited, 2ª Edition. London, 1978.

QI, M.; HETTIARACHCHY, N. S.; KALAPATHY, U. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. **Journal of Food Science**. v. 62 (6), p. 1110 – 1115, 1997.

QUAGLIA, G. B.; ORBAN, E. Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysates. **Journal of Food Science**. v. 55, p. 1571, 1990.

REGENSTEIN, J. M.; CORIMAR, T. S.; SHERBON, J. M. Measuring the water holding capacity of natural actomyosin from chicken breast muscle in the presence of pyrophosphate and divalent cations. **Journal of Food Biochemistry**. v. 3, p. 205 - 211, 1979.

ROBINSON, D. S.; **Bioquímica y Valor Nutritivo de los Alimentos**. Ed. Acribia, S. A. España, 1991.

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Efeito da Hidrólise Enzimática sobre Propriedades Funcionais de Caseína Bovina Coagulada pela Ação da Quimosina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25 (3), p. 468 – 474, 2005.

SANTOS, S. D. **Obtenção e Avaliação de Hidrolisado Enzimático Obtido a partir de Pescado de Baixo Valor Comercial**. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 56 - 95 p., 2006.

SARA E.; ORTIZ M.; WAGNER J. R. Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. **Food Research International**. v. 35, p. 511 – 518, 2002.

SCHMIDL, M. K.; TAYLOR, S. L.; NORDLEE, J. A. Use of hydrolysate-based products in special medical diets. **Food Technology**. p. 77 – 85, 1994.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em Alimentos Protéicos. Propriedades** - Degradações - Modificações. Livraria Varela. São Paulo, SP, 1996.

SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. **Boletim SBCTA**. V. 32, p. 105 1998.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q.; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus viliosus*). **Food Chemistry**. v.53, p. 285 - 292, 1995.

SILVA P. M. E. M.; MAZZILLI R. N.; CUSIN F.; Composition of hydrolysates from meat. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 12, p. 219 - 225. 1999.

SIMPSON B. K.; JAMES, J. Application of enzymes in food processing. **Food Science and Nutrition**. v. 36(5) p. 437 - 463. 1996.

SIMPSON B. K.; NAYERI G.; YAYLAYAN V.; ASHIE I. N. A. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. **Food Chemistry**. v. 61, p. 131 - 138. 1998.

SLYZYTE, R.; DAUKSAS, E.; FALCH, E.; STORRO, I.; RUSTAD, T. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) By-products. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 1415 – 1424, 2005.

SMYTH, M.; FITZGERALD, R. J. Relationship between some characteristics WPC hydrolysates and the enzyme complement in commercially available proteinase preparations. **International Dairy Journal**. v. 8, p. 819 – 827, 1998.

SOUZA, H. B. A. **Parâmetros Físicos e Sensoriais Utilizados para Avaliação de Qualidade de Carne de Frango**. V Seminário Internacional de Aves e Suínos – Florianópolis (SC) 2005.

SOARES, L. H. B.; MARQUES, D. N.; ALBUQUERQUE, P. M. AYUB, M. A. Z. Influence of some commercial proteases and enzymatic associations on the hydrolytic solubilization of deboned poultry meat proteins. **Food Science and Technology International**. v. 6 (4), p. 301 - 306, 2000.

STANLEY, D. W. Non-bitter protein hydrolysates. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**. v. 14, p. 49 -52, 1981.

SURÓWKA, K.; FIK, M. Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. I. An application of Neutrase to the production of protein hydrolysate. **Journal of Food Science and Technology**. v. 27, p. 9-20, 1992.

SURÓWKA, K.; DANIEL, Z.; FIK, M.; MACURA, R.; LASOCHA, W.; New proteins preparations from flour obtained by limited enzymic hydrolysis of extrudates. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 5, p. 225 – 234, 2004.

TARDIOLI, P. W. **Hidrólise Controlada de Proteínas do Soro de Queijo Usando Carboxipeptidase A e Alcalase® Imobilizadas Multipontualmente em Agarose**. Dissertação de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), São Carlos, SP, 12 - 48 p., 2003.

TELLO-PANDURO, B.; GARCIA-VASQUES, Y.; MEDINA-VIVANCO, M.; MENDIETA-TABOTA. Air drying of clams (*Anodonites trapesialis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fillet. **Drying 2004 –Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS 2004)**. São Paulo, Brazil, v. C, p. 1977 -1983, 2004.

TURGEON, S. L.; GAUTHIER, S. F.; PAQUIN, P. Interfacial and emulsifying properties of whey peptide fraction obtained with a two step ultrafiltration process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.39, p. 637. 1991.

TREYBAL, R. E. **Mass Transfer Operations**. 3^a edição. McGraw-Hill Book Company Singapore. 784p, 1981.

VEGA-MERCADO, H.; GÓNGORA-NIETO, M.; BARBOSA-CÂNOVAS, G. V. Advances in deshydration of Foods. **Journal of Food Engineering**, v. 49, p. 271 – 289, 2001.

VILLELA, F. A.; SILVA, W. R. Curvas de secagem de sementes de milho utilizando o método intermitente. **Scientia Agrícola**, v. 49 (1), p. 145 – 153, 1992.

WANG, J. C.; KINSELLA, J. E. Functional properties of novel proteins: alfalfa leaf protein. **Journal Food science**. v. 41, p. 286 – 292, 1976.

WARD, O. P. **Proteolytic enzymes**. In: BLANCH, H. W.; DREW, S.; WANG, D. I. C. (Eds.). *Comprehensive biotechnology*. Oxford: Pergamon Press Ltda., 1985. v. 3, p. 789-817.

WHITAKER, R. **Principles of Enzymology for Food Science**. Marcel Decker, N.Y., 1994.

WISEMAN, A. **Manual de Biotecnologia de las Enzimas**. Livraria Varela. Editora Acribia, S.A. Zaragoza, Espanha, 1985.

YU, S. Y.; TAN, I. K. Acceptability of crackers with fish protein hydrolysate. **International Journal of food Science and Technology**. v. 25, p. 204 -208, 1990.

ANEXO A

Tabela A.1: Coeficientes de regressão obtidos para o modelo de GH em peito de frango com a enzima Alcalase.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(2)	p - valor	Lim. de conf. -95%	Lim. de conf. +95%
Mean/Interc.	33,08884	0,158412	208,879	0,000023	32,40724	33,77043
(1)[S] (%p/v)(L)	-9,10407	0,074435	-122,309	0,000067	-9,42434	-8,78380
[S] (%p/v)(Q)	2,18979	0,082003	26,704	0,001399	1,83696	2,54262
(2)[E] (%p/p)(L)	1,96488	0,074435	26,397	0,001432	1,64461	2,28515
[E] (%p/p)(Q)	-1,20626	0,082003	-14,710	0,004590	-1,55909	-0,85342
(3)t (min)(L)	0,98376	0,074435	13,216	0,005676	0,66349	1,30403
t (min)(Q)	-1,32141	0,082003	-16,114	0,003829	-1,67424	-0,96857
1L by 2L	-2,37500	0,097211	-24,431	0,001671	-2,79327	-1,95673
1L by 3L	-0,43250	0,097211	-4,449	0,046987	-0,85077	-0,01423

Tabela A.2: Coeficientes de regressão obtidos para o modelo de GH em coxa de frango com a enzima Alcalase.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(2)	p - valor	Lim. de conf. -95%	Lim. de conf. +95%
Mean/Interc.	29,48176	0,208228	141,5842	0,000050	28,58583	30,37770
(1)[S] (%p/v)(L)	-6,65634	0,232423	-28,6389	0,001217	-7,65637	-5,65630
(3)t(min) (L)	2,15751	0,232423	9,2827	0,011407	1,15747	3,15755

Tabela A.3: Coeficientes de regressão obtidos para o modelo de GH em coxa de frango com a enzima Flavourzyme.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(2)	p - valor	Lim. de conf. -95%	Lim. de conf. +95%
Mean/Interc.	17,14717	0,160065	107,1264	0,000087	16,45846	17,83587
(1)[S] (%p/v)(L)	-1,85090	0,131579	-14,0668	0,005016	-2,41704	-1,28476
(2)[E] (%p/p)(L)	3,29327	0,131579	25,0288	0,001593	2,72713	3,85941
[E] (%p/p)(Q)	-0,98732	0,134906	-7,3186	0,018163	-1,56778	-0,40687
(3)t(min) (L)	1,31877	0,131579	10,0227	0,009809	0,75263	1,88491

ANEXO B

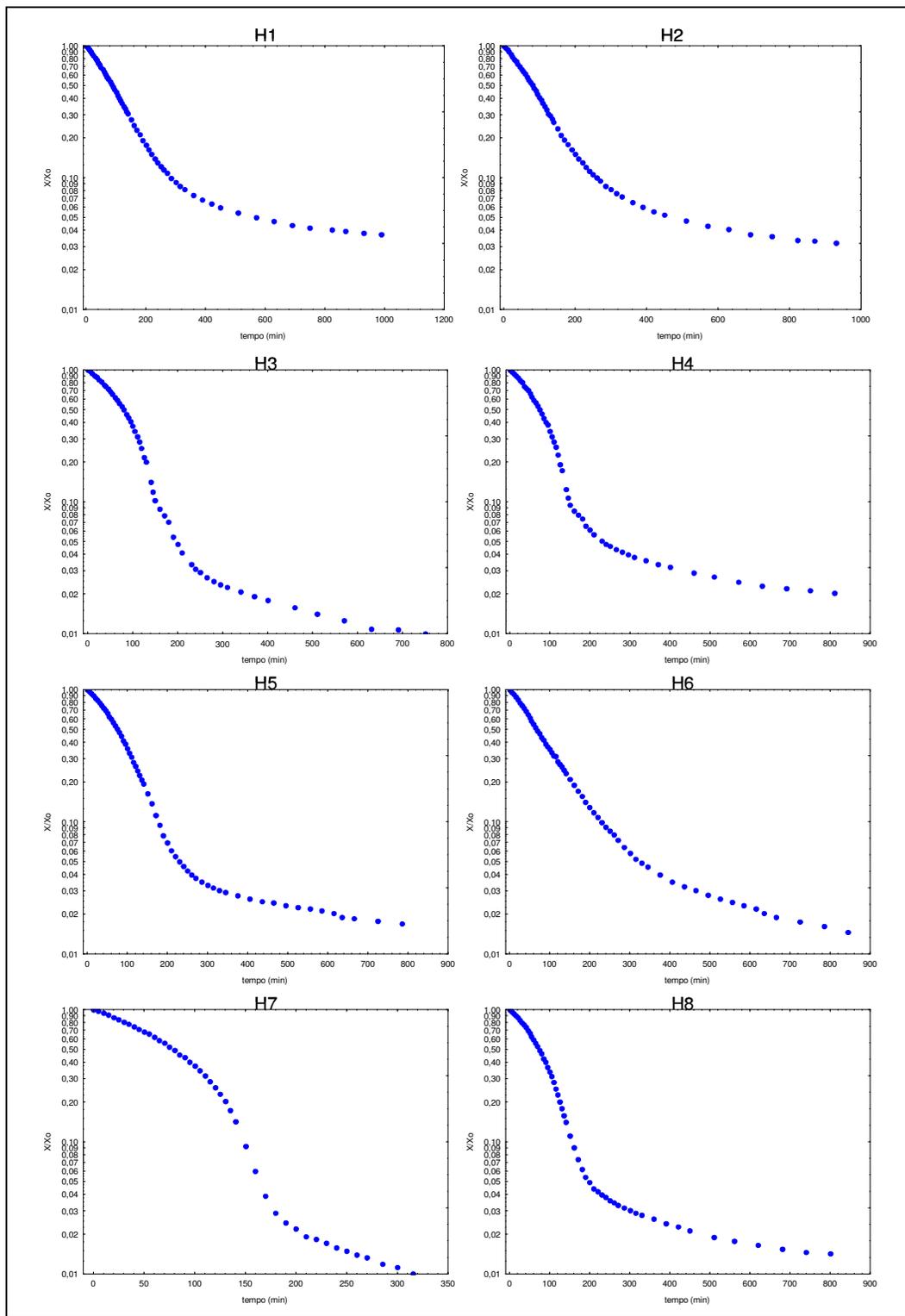


Figura B.1 – Curvas de dimensional de umidade em escala logarítmica em função do tempo de secagem dos hidrolisados de carne de frango com enzimas proteolíticas.

ANEXO C

Tabela C.1: Teste Tukey ($p < 0,05$) para solubilidade das amostras em pH3.

Amostras	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
H1 {1}		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000395	0,000179
H2 {2}	0,000179		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179
H3 {3}	0,000179	0,000179		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179
H4 {4}	0,000179	0,000179	0,000179		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179
H5 {5}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179		0,025127	0,000964	0,000179	0,000179	0,000179
H6 {6}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,025127		0,850567	0,000179	0,000179	0,000179
H7 {7}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000964	0,850567		0,000179	0,000179	0,000179
H8 {8}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179		0,000179	0,000179
Pi {9}	0,000395	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179		0,000179
Ci {10}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	

Tabela C.2: Teste Tukey ($p < 0,05$) para solubilidade das amostras em pH5.

Amostras	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
H1 {1}		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000187	0,000179	0,000179
H2 {2}	0,000179		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179
H3 {3}	0,000179	0,000179		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179
H4 {4}	0,000179	0,000179	0,000179		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179
H5 {5}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179		0,000411	0,327284	0,000179	0,000179	0,000179
H6 {6}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000411		0,057630	0,000187	0,002618	0,001798
H7 {7}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,327284	0,057630		0,000179	0,000186	0,000179
H8 {8}	0,000187	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000187	0,000179		0,127238	0,176498
Pi {9}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,002618	0,000186	0,127238		1,000000
Ci {10}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,001798	0,000179	0,176498	1,000000	

Tabela C.3: Teste Tukey ($p < 0,05$) para solubilidade das amostras em pH5.

Amostras	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
H1 {1}		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000186	0,000179	0,104138	0,999987	0,395275
H2 {2}	0,000179		0,000699	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179
H3 {3}	0,000179	0,000699		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179
H4 {4}	0,000179	0,000179	0,000179		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179
H5 {5}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179		0,003806	0,237406	0,000179	0,000179	0,000179
H6 {6}	0,000186	0,000179	0,000179	0,000179	0,003806		0,573369	0,002595	0,000179	0,000564
H7 {7}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,237406	0,573369		0,000203	0,000179	0,000188
H8 {8}	0,104138	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,002595	0,000203		0,045109	0,997663
Pi {9}	0,999987	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,045109		0,206179
Ci {10}	0,395275	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000564	0,000188	0,997663	0,206179	

Tabela C.4: Teste Tukey ($p < 0,05$) para solubilidade das amostras em pH9.

Amostras	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
H1 {1}		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000251	0,000218	0,690702	0,005630	0,008978
H2 {2}	0,000179		0,425183	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179
H3 {3}	0,000179	0,425183		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179
H4 {4}	0,000179	0,000179	0,000179		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179
H5 {5}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179		0,056452	0,097723	0,000186	0,000179	0,000179
H6 {6}	0,000251	0,000179	0,000179	0,000179	0,056452		1,000000	0,005169	0,000179	0,000179
H7 {7}	0,000218	0,000179	0,000179	0,000179	0,097723	1,000000		0,002852	0,000179	0,000179
H8 {8}	0,690702	0,000179	0,000179	0,000179	0,000186	0,005169	0,002852		0,000258	0,000308
Pi {9}	0,005630	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000258		1,000000
Ci {10}	0,008978	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000308	1,000000	

Tabela C.5: Teste Tukey ($p < 0,05$) para solubilidade das amostras em pH11.

Amostras	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
H1 {1}		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000459	0,000179	0,761101
H2 {2}	0,000179		0,002112	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,757889	0,000179
H3 {3}	0,000179	0,002112		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000216	0,000179
H4 {4}	0,000179	0,000179	0,000179		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179
H5 {5}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179		0,953646	0,936691	0,000219	0,000179	0,000179
H6 {6}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,953646		1,000000	0,000861	0,000179	0,000179
H7 {7}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,936691	1,000000		0,000978	0,000179	0,000179
H8 {8}	0,000459	0,000179	0,000179	0,000179	0,000219	0,000861	0,000978		0,000179	0,000189
Pi {9}	0,000179	0,757889	0,000216	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179		0,000197
Ci {10}	0,761101	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000189	0,000197	

Tabela C.6: Teste Tukey ($p < 0,05$) para solubilidade de H1 em diferentes pHs.

pHs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
pH3 {1}		0,084570	0,999793	0,781227	0,000176
pH5 {2}	0,084570		0,109368	0,419941	0,000176
pH7 {3}	0,999793	0,109368		0,860697	0,000176
pH9 {4}	0,781227	0,419941	0,860697		0,000176
pH11 {5}	0,000176	0,000176	0,000176	0,000176	

Tabela C.7: Teste Tukey ($p < 0,05$) para solubilidade de H2 em diferentes pHs.

pHs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
pH3 {1}		0,992609	0,863424	0,991248	0,000176
pH5 {2}	0,992609		0,648740	0,906503	0,000176
pH7 {3}	0,863424	0,648740		0,982016	0,000176
pH9 {4}	0,991248	0,906503	0,982016		0,000176
pH11 {5}	0,000176	0,000176	0,000176	0,000176	

Tabela C.8: Teste Tukey ($p < 0,05$) para solubilidade de H3 em diferentes pHs.

pHs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
pH3 {1}		0,984285	0,908646	0,024656	0,201815
pH5 {2}	0,984285		0,663017	0,011342	0,094611
pH7 {3}	0,908646	0,663017		0,091534	0,575248
pH9 {4}	0,024656	0,011342	0,091534		0,650780
pH11 {5}	0,201815	0,094611	0,575248	0,650780	

Tabela C.9: Teste Tukey ($p < 0,05$) para solubilidade de H4 em diferentes pHs.

pHs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
pH3 {1}		0,670131	0,993650	0,983285	0,379584
pH5 {2}	0,670131		0,448752	0,390531	0,054128
pH7 {3}	0,993650	0,448752		0,999950	0,590149
pH9 {4}	0,983285	0,390531	0,999950		0,656975
pH11 {5}	0,379584	0,054128	0,590149	0,656975	

Tabela C.10: Teste Tukey ($p < 0,05$) para solubilidade de H5 em diferentes pHs.

pHs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
pH3 {1}		0,963030	0,889487	0,639987	0,000416
pH5 {2}	0,963030		0,998955	0,938351	0,000767
pH7 {3}	0,889487	0,998955		0,985640	0,001021
pH9 {4}	0,639987	0,938351	0,985640		0,001860
pH11 {5}	0,000416	0,000767	0,001021	0,001860	

Tabela C.11: Teste Tukey ($p < 0,05$) para solubilidade de H6 em diferentes pHs.

pHs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
pH3 {1}		0,035052	0,000519	0,000742	0,000483
pH5 {2}	0,035052		0,058776	0,103021	0,051652
pH7 {3}	0,000519	0,058776		0,995577	0,999987
pH9 {4}	0,000742	0,103021	0,995577		0,990324
pH11 {5}	0,000483	0,051652	0,999987	0,990324	

Tabela C.12: Teste Tukey ($p < 0,05$) para solubilidade de H7 em diferentes pHs.

pHs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
pH3 {1}		0,004257	0,037416	0,000176	0,000176
pH5 {2}	0,004257		0,000208	0,000176	0,000176
pH7 {3}	0,037416	0,000208		0,000197	0,000176
pH9 {4}	0,000176	0,000176	0,000197		0,026419
pH11 {5}	0,000176	0,000176	0,000176	0,026419	

Tabela C.13: Teste Tukey ($p < 0,05$) para solubilidade de H8 em diferentes pHs.

pHs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
pH3 {1}		0,688556	0,000302	0,000190	0,000178
pH5 {2}	0,688556		0,000945	0,000264	0,000191
pH7 {3}	0,000302	0,000945		0,542923	0,099145
pH9 {4}	0,000190	0,000264	0,542923		0,712479
pH11 {5}	0,000178	0,000191	0,099145	0,712479	

Tabela C.14: Teste Tukey ($p < 0,05$) para solubilidade de peito *in* em diferentes pHs.

pHs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
pH3 {1}		0,000645	0,511876	0,553243	0,000396
pH5 {2}	0,000645		0,004849	0,000231	0,000176
pH7 {3}	0,511876	0,004849		0,058805	0,000199
pH9 {4}	0,553243	0,000231	0,058805		0,002083
pH11 {5}	0,000396	0,000176	0,000199	0,002083	

Tabela C.15: Teste Tukey ($p < 0,05$) para solubilidade de coxa *in* em diferentes pHs.

pHs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
pH3 {1}		0,000176	0,000176	0,000176	0,000176
pH5 {2}	0,000176		0,032974	0,000184	0,000179
pH7 {3}	0,000176	0,032974		0,001389	0,000594
pH9 {4}	0,000176	0,000184	0,001389		0,935423
pH11 {5}	0,000176	0,000179	0,000594	0,935423	

Tabela C.16: Teste Tukey ($p < 0,05$) para CRA das amostras em pH3.

Amostras	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
H1 {1}		0,074735	0,046010	0,046010	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,046010
H2 {2}	0,074735		1,000000	1,000000	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	1,000000
H3 {3}	0,046010	1,000000		1,000000	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	1,000000
H4 {4}	0,046010	1,000000	1,000000		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	1,000000
H5 {5}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179		1,000000	0,476331	0,000179	0,982488	0,000179
H6 {6}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	1,000000		0,356650	0,000179	0,945427	0,000179
H7 {7}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,476331	0,356650		0,000232	0,972450	0,000179
H8 {8}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000232		0,000188	0,000179
Pi {9}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,982488	0,945427	0,972450	0,000188		0,000179
Ci {10}	0,046010	1,000000	1,000000	1,000000	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	

Tabela C.17: Teste Tukey ($p < 0,05$) para CRA das amostras em pH5.

Amostras	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
H1 {1}		0,004268	0,004268	0,004268	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,004268	0,004268
H2 {2}	0,004268		1,000000	1,000000	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	1,000000	1,000000
H3 {3}	0,004268	1,000000		1,000000	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	1,000000	1,000000
H4 {4}	0,004268	1,000000	1,000000		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	1,000000	1,000000
H5 {5}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179		0,794465	0,263292	0,005274	0,000179	0,000179
H6 {6}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,794465		0,009821	0,000291	0,000179	0,000179
H7 {7}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,263292	0,009821		0,627754	0,000179	0,000179
H8 {8}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,005274	0,000291	0,627754		0,000179	0,000179
Pi {9}	0,004268	1,000000	1,000000	1,000000	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179		1,000000
Ci {10}	0,004268	1,000000	1,000000	1,000000	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	1,000000	

Tabela C.18: Teste Tukey ($p < 0,05$) para CRA das amostras em pH7.

Amostras	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
H1 {1}		0,208213	0,208213	0,208213	0,000179	0,000179	0,000179	0,001504	0,991484	0,000211
H2 {2}	0,208213		1,000000	1,000000	0,000179	0,000179	0,000179	0,000187	0,033093	0,000179
H3 {3}	0,208213	1,000000		1,000000	0,000179	0,000179	0,000179	0,000187	0,033093	0,000179
H4 {4}	0,208213	1,000000	1,000000		0,000179	0,000179	0,000179	0,000187	0,033093	0,000179
H5 {5}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179		0,669291	0,718758	0,052778	0,000188	0,694596
H6 {6}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,669291		1,000000	0,001005	0,000179	0,032093
H7 {7}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,718758	1,000000		0,001177	0,000179	0,038164
H8 {8}	0,001504	0,000187	0,000187	0,000187	0,052778	0,001005	0,001177		0,011435	0,805480
Pi {9}	0,991484	0,033093	0,033093	0,033093	0,000188	0,000179	0,000179	0,011435		0,000448
Ci {10}	0,000211	0,000179	0,000179	0,000179	0,694596	0,032093	0,038164	0,805480	0,000448	

Tabela C.19: Teste Tukey ($p < 0,05$) para CRA das amostras em pH9.

Amostras	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
H1 {1}		0,003569	0,003569	0,003569	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179
H2 {2}	0,003569		1,000000	1,000000	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179
H3 {3}	0,003569	1,000000		1,000000	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179
H4 {4}	0,003569	1,000000	1,000000		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179
H5 {5}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179		0,999996	1,000000	0,000179	0,623125	0,000179
H6 {6}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,999996		0,999992	0,000179	0,402941	0,000179
H7 {7}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	1,000000	0,999992		0,000179	0,640662	0,000179
H8 {8}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179		0,000179	0,000179
Pi {9}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,623125	0,402941	0,640662	0,000179		0,000179
Ci {10}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	

Tabela C.20: Teste Tukey ($p < 0,05$) para CRA das amostras em pH11.

Amostras	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
H1 {1}		0,847108	0,847108	0,847108	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,847108	0,847108
H2 {2}	0,847108		1,000000	1,000000	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	1,000000	1,000000
H3 {3}	0,847108	1,000000		1,000000	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	1,000000	1,000000
H4 {4}	0,847108	1,000000	1,000000		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	1,000000	1,000000
H5 {5}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179		0,979686	0,000531	0,000179	0,000179	0,000179
H6 {6}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,979686		0,000210	0,000179	0,000179	0,000179
H7 {7}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000531	0,000210		0,000728	0,000179	0,000179
H8 {8}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000728		0,000179	0,000179
Pi {9}	0,847108	1,000000	1,000000	1,000000	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179		1,000000
Ci {10}	0,847108	1,000000	1,000000	1,000000	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	1,000000	

Tabela C.21: Teste Tukey ($p < 0,05$) para CRA de H1 em diferentes pHs.

pHs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
pH3 {1}		0,178894	0,075598	0,264295	0,551384
pH5 {2}	0,178894		0,976088	0,998484	0,016561
pH7 {3}	0,075598	0,976088		0,907800	0,007053
pH9 {4}	0,264295	0,998484	0,907800		0,025336
pH11 {5}	0,551384	0,016561	0,007053	0,025336	

Tabela C.22: Teste Tukey ($p < 0,05$) para CRA de H2 em diferentes pHs.

pHs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
pH3 {1}		0,000176	0,000176	0,000176	0,000176
pH5 {2}	0,000176		1,000000	1,000000	1,000000
pH7 {3}	0,000176	1,000000		1,000000	1,000000
pH9 {4}	0,000176	1,000000	1,000000		1,000000
pH11 {5}	0,000176	1,000000	1,000000	1,000000	

Tabela C.23: Teste Tukey ($p < 0,05$) para CRA de H5 em diferentes pHs.

pHs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
pH3 {1}		0,983559	0,996349	0,999746	0,959300
pH5 {2}	0,983559		0,902932	0,952884	0,759761
pH7 {3}	0,996349	0,902932		0,999786	0,997434
pH9 {4}	0,999746	0,952884	0,999786		0,986702
pH11 {5}	0,959300	0,759761	0,997434	0,986702	

Tabela C.24: Teste Tukey ($p < 0,05$) para CRA de H6 em diferentes pHs.

pHs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
pH3 {1}		0,843589	0,011537	0,997343	0,527592
pH5 {2}	0,843589		0,054558	0,677637	0,973793
pH7 {3}	0,011537	0,054558		0,007184	0,134039
pH9 {4}	0,997343	0,677637	0,007184		0,365013
pH11 {5}	0,527592	0,973793	0,134039	0,365013	

Tabela C.25: Teste Tukey ($p < 0,05$) para CRA de H7 em diferentes pHs.

pHs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
pH3 {1}		0,548893	0,003841	0,485199	0,445247
pH5 {2}	0,548893		0,000586	0,053796	0,999644
pH7 {3}	0,003841	0,000586		0,047159	0,000493
pH9 {4}	0,485199	0,053796	0,047159		0,039859
pH11 {5}	0,445247	0,999644	0,000493	0,039859	

Tabela C.26: Teste Tukey ($p < 0,05$) para CRA de H8 em diferentes pHs.

pHs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
pH3 {1}		0,647914	0,999974	0,086631	0,438621
pH5 {2}	0,647914		0,704085	0,010325	0,061468
pH7 {3}	0,999974	0,704085		0,074275	0,389588
pH9 {4}	0,086631	0,010325	0,074275		0,770081
pH11 {5}	0,438621	0,061468	0,389588	0,770081	

Tabela C.27: Teste Tukey ($p < 0,05$) para CRA de peito *in natura* em diferentes pHs.

pHs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
pH3 {1}		0,000182	0,000785	0,686165	0,000182
pH5 {2}	0,000182		0,049467	0,000177	1,000000
pH7 {3}	0,000785	0,049467		0,000275	0,049467
pH9 {4}	0,686165	0,000177	0,000275		0,000177
pH11 {5}	0,000182	1,000000	0,049467	0,000177	

Tabela C.28: Teste Tukey ($p < 0,05$) para CRA de coxa *in natura* em diferentes pHs.

pHs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
pH3 {1}		1,000000	0,000183	0,000176	1,000000
pH5 {2}	1,000000		0,000183	0,000176	1,000000
pH7 {3}	0,000183	0,000183		0,000176	0,000183
pH9 {4}	0,000176	0,000176	0,000176		0,000176
pH11 {5}	1,000000	1,000000	0,000183	0,000176	

Obs.: Para os hidrolisados H3 e H4 não houve diferença significativa, a 5% de significância, de CRA nos diferentes valores de pH.

Tabela C.29: Teste Tukey ($p < 0,05$) para capacidade emulsificante dos hidrolisados e de peito e coxa de frango *in natura*.

Amostras	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
H1 {1}		0,352333	0,999224	0,000734	0,000179	0,026954	0,999224	0,026954	0,000179	0,000179
H2 {2}	0,352333		0,109123	0,109123	0,000179	0,000290	0,109123	0,000290	0,000179	0,000179
H3 {3}	0,999224	0,109123		0,000290	0,000186	0,109123	1,000000	0,109123	0,000179	0,000179
H4 {4}	0,000734	0,109123	0,000290		0,000179	0,000179	0,000290	0,000179	0,000179	0,000179
H5 {5}	0,000179	0,000179	0,000186	0,000179		0,001414	0,000186	0,001414	0,000179	0,000179
H6 {6}	0,026954	0,000290	0,109123	0,000179	0,001414		0,109123	1,000000	0,000179	0,000179
H7 {7}	0,999224	0,109123	1,000000	0,000290	0,000186	0,109123		0,109123	0,000179	0,000179
H8 {8}	0,026954	0,000290	0,109123	0,000179	0,001414	1,000000	0,109123		0,000179	0,000179
P1 {9}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179		0,352333
C1 {10}	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,352333	

Tabela C.30: Teste Tukey ($p < 0,05$) para capacidade de retenção de óleo dos hidrolisados e de peito e coxa de frango *in natura*.

Amostras	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
H1 {1}		0,000179	0,482558	0,000179	0,906968	0,000206	0,482558	0,000206	0,142861	0,000179
H2 {2}	0,000179		0,000179	1,000000	0,000179	0,000830	0,000179	0,000830	0,000179	0,998008
H3 {3}	0,482558	0,000179		0,000179	0,998008	0,004034	1,000000	0,004034	0,998008	0,000179
H4 {4}	0,000179	1,000000	0,000179		0,000179	0,000830	0,000179	0,000830	0,000179	0,998008
H5 {5}	0,906968	0,000179	0,998008	0,000179		0,000830	0,998008	0,000830	0,844003	0,000179
H6 {6}	0,000206	0,000830	0,004034	0,000830	0,000830		0,004034	1,000000	0,021771	0,000285
H7 {7}	0,482558	0,000179	1,000000	0,000179	0,998008	0,004034		0,004034	0,998008	0,000179
H8 {8}	0,000206	0,000830	0,004034	0,000830	0,000830	1,000000	0,004034		0,021771	0,000285
Pi {9}	0,142861	0,000179	0,998008	0,000179	0,844003	0,021771	0,998008	0,021771		0,000179
Ci {10}	0,000179	0,998008	0,000179	0,998008	0,000179	0,000285	0,000179	0,000285	0,000179	

Tabela C.31: Teste Tukey ($p < 0,05$) para capacidade formação de espuma dos hidrolisados e de peito e coxa de frango *in natura*.

Amostras	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
H1 {1}		0,414125	0,000179	0,117453	0,414125	0,117453	0,944036	0,414125	0,970086	0,998238
H2 {2}	0,414125		0,000179	0,998238	1,000000	0,998238	0,986008	1,000000	0,970086	0,117453
H3 {3}	0,000179	0,000179		0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179
H4 {4}	0,117453	0,998238	0,000179		0,998238	1,000000	0,722203	0,998238	0,645305	0,024886
H5 {5}	0,414125	1,000000	0,000179	0,998238		0,998238	0,986008	1,000000	0,970086	0,117453
H6 {6}	0,117453	0,998238	0,000179	1,000000	0,998238		0,722203	0,998238	0,645305	0,024886
H7 {7}	0,944036	0,986008	0,000179	0,722203	0,986008	0,722203		0,986008	1,000000	0,566204
H8 {8}	0,414125	1,000000	0,000179	0,998238	1,000000	0,998238	0,986008		0,970086	0,117453
Pi {9}	0,970086	0,970086	0,000179	0,645305	0,970086	0,645305	1,000000	0,970086		0,645305
Ci {10}	0,998238	0,117453	0,000179	0,024886	0,117453	0,024886	0,566204	0,117453	0,645305	

Tabela C.32: Teste Tukey ($p < 0,05$) para estabilidade de espuma formada pelo H1 ao longo do tempo.

tempo (min)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
1 {1}		0,127129	0,001067	0,000191	0,000182
5 {2}	0,127129		0,046471	0,000816	0,000446
10 {3}	0,001067	0,046471		0,089643	0,033581
30 {4}	0,000191	0,000816	0,089643		0,965541
60 {5}	0,000182	0,000446	0,033581	0,965541	

Tabela C.33: Teste Tukey ($p < 0,05$) para estabilidade de espuma formada pelo H2 ao longo do tempo.

tempo (min)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
1 {1}		0,066767	0,000854	0,000185	0,000176
5 {2}	0,066767		0,066767	0,000854	0,000185
10 {3}	0,000854	0,066767		0,066767	0,000854
30 {4}	0,000185	0,000854	0,066767		0,066767
60 {5}	0,000176	0,000185	0,000854	0,066767	

Tabela C.34: Teste Tukey ($p < 0,05$) para estabilidade de espuma formada pelo H3 ao longo do tempo.

tempo (min)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
1 {1}		0,046721	0,005500	0,002773	0,002773
5 {2}	0,046721		0,629347	0,369075	0,369075
10 {3}	0,005500	0,629347		0,986162	0,986162
30 {4}	0,002773	0,369075	0,986162		1,000000
60 {5}	0,002773	0,369075	0,986162	1,000000	

Tabela C.35: Teste Tukey ($p < 0,05$) para estabilidade de espuma formada pelo H4 ao longo do tempo.

tempo (min)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
1 {1}		0,000176	0,000176	0,000176	0,000176
5 {2}	0,000176		1,000000	1,000000	1,000000
10 {3}	0,000176	1,000000		1,000000	1,000000
30 {4}	0,000176	1,000000	1,000000		1,000000
60 {5}	0,000176	1,000000	1,000000	1,000000	

Tabela C.36: Teste Tukey ($p < 0,05$) para estabilidade de espuma formada pelo H5 ao longo do tempo.

tempo (min)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
1 {1}		0,011659	0,001649	0,000727	0,000727
5 {2}	0,011659		0,633156	0,283138	0,283138
10 {3}	0,001649	0,633156		0,950231	0,950231
30 {4}	0,000727	0,283138	0,950231		1,000000
60 {5}	0,000727	0,283138	0,950231	1,000000	

Tabela C.37: Teste Tukey ($p < 0,05$) para estabilidade de espuma formada pelo H6 ao longo do tempo.

tempo (min)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
1 {1}		0,066767	0,000854	0,000185	0,000176
5 {2}	0,066767		0,066767	0,000854	0,000185
10 {3}	0,000854	0,066767		0,066767	0,000854
30 {4}	0,000185	0,000854	0,066767		0,066767
60 {5}	0,000176	0,000185	0,000854	0,066767	

Tabela C.38: Teste Tukey ($p < 0,05$) para estabilidade de espuma formada pelo H7 ao longo do tempo.

tempo (min)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
1 {1}		0,013159	0,000186	0,000186	0,000177
5 {2}	0,013159		0,003397	0,003397	0,000595
10 {3}	0,000186	0,003397		1,000000	0,607633
30 {4}	0,000186	0,003397	1,000000		0,607633
60 {5}	0,000177	0,000595	0,607633	0,607633	

Tabela C.39: Teste Tukey ($p < 0,05$) para estabilidade de espuma formada pelo H8 ao longo do tempo.

tempo (min)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
1 {1}		0,027107	0,006470	0,002505	0,001265
5 {2}	0,027107		0,868421	0,507699	0,259655
10 {3}	0,006470	0,868421		0,955826	0,736098
30 {4}	0,002505	0,507699	0,955826		0,979995
60 {5}	0,001265	0,259655	0,736098	0,979995	

Tabela C.40: Teste Tukey ($p < 0,05$) para estabilidade de espuma formada pelo peito de frango *in natura* ao longo do tempo.

tempo (min)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
1 {1}		0,039803	0,000450	0,000450	0,000184
5 {2}	0,039803		0,039803	0,039803	0,001118
10 {3}	0,000450	0,039803		1,000000	0,156753
30 {4}	0,000450	0,039803	1,000000		0,156753
60 {5}	0,000184	0,001118	0,156753	0,156753	

Tabela C.40: Teste Tukey ($p < 0,05$) para estabilidade de espuma formada pela coxa de frango *in natura* ao longo do tempo.

tempo (min)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
1 {1}		1,000000	0,001370	0,001370	0,000258
5 {2}	1,000000		0,001370	0,001370	0,000258
10 {3}	0,001370	0,001370		1,000000	0,359439
30 {4}	0,001370	0,001370	1,000000		0,359439
60 {5}	0,000258	0,000258	0,359439	0,359439	